

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



## **THÈSE**

Pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR EN SCIENCES

En: **Sciences Biologiques**

Présentée par Mr: **ZABOURI Younes**

## **THÈME**

**Etude de l'activité antifongique des bactéries  
lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes**

Devant le jury :

Mme.HAMMADI Kheira	Pr. Univ Mostaganem	<b>Présidente</b>
Mr. CHERIGUENE Abderrahim	Pr. Univ Mostaganem	<b>Directeur de thèse</b>
Mme.CHOUGRANI Fadela	Pr. Univ Mostaganem	<b>Co-Directrice de thèse</b>
Mr. BENSOLTANE Ahmed	Pr. Univ d'Oran 1	<b>Examineur</b>
Mr. BEKADA Ahmed	Pr. C. U. Tissemsilt	<b>Examineur</b>
Mr. YEZLI Wassim	MCA. U. Tiaret	<b>Examineur</b>

**Année Universitaire 2020-2021**

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM**  
**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

## **THÈSE**

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN SCIENCES

En : **Sciences Biologiques**

Présentée par M: **ZABOURI Younes**

## **THÈME**

**Etude de l'activité antifongique des bactéries  
lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes**

Devant le jury :

Mme. HAMMADI Kheira

Mr. CHERIGUENE Abderrahim

Mme. CHOUGRANI Fadela

Mr. BENSOLTANE Ahmed

Mr. BEKADA Ahmed

Mr. YEZLI Wassim

Pr. Univ Mostaganem

Pr. Univ Mostaganem

Pr. Univ Mostaganem

Pr. Univ d'Oran 1

Pr.C. U. Tissemsilt

MCA. U. Tiaret

**Présidente**

**Directeur de thèse**

**Co-Directrice de thèse**

**Examineur**

**Examineur**

**Examineur**

**Année Universitaire 2020-2021**

## Remerciements

Avant tout, Nous remercions ALLAH de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons particulièrement à remercier nos parents, beaux parents et mes trois petits anges pour leur soutien permanent et le réconfort qu'ils nous ont prodigé tout au long de notre cursus universitaire.

Nous adressons toute notre gratitude à Monsieur le **Professeur CHERIGUENE Abderrahim**, qui nous a suggéré ce sujet de thèse et qui a porté un intérêt tout particulier à la réalisation de ce travail, nous exprimons notre très grande reconnaissance et lui témoignons de notre profond attachement pour l'attention qu'il a porté à cette thèse, pour les encouragements, et la confiance qu'il m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à notre égard.

Nous sommes également extrêmement reconnaissant envers mon co-directeur de thèse, **Professeur CHOUGRANI Fadila**, de m'avoir encadré et fait confiance. Merci pour sa disponibilité, ses enseignements, ses conseils, sa perspicacité, sa patience, qui m'ont énormément aidé et m'ont permis de grandir et de beaucoup progresser.

Nous le remercions Madame le **Professeur HAMMADI Kheira** qui nous a fait un grand honneur de présider le jury.

Je tiens également à remercier **Pr. URZI Clara, Pr DELEO Filomena**, de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et aussi pour les conseils et réflexions qu'elles m'ont donnés au cours de mon stage à l'Université de Messina. Italie.

Nous remercions Messieurs les membres du jury **Pr. BENSOLTANE Ahmed, Pr. BEKADA Ahmed, Dr. YEZLI Wassim**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce modeste travail. Nous sommes particulièrement reconnaissants et honorés par leur participation au jury de cette thèse.

Un grand merci à la technicienne de LMA **Mme ZAIKH Nawel** qui a répondu à toutes mes demandes.

Mes sincères remerciements s'adressent à ma femme qui m'a aidé tout au long de mon travail **Dr MERZOUK Yamina**.

*Merci à toute personne, qui a de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.*

## Dédicaces

Je dédie cette thèse ...

À MES CHERS PARENTS Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon Amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et J'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A MON BIEN AIMER FILS Rayane ET MES CHERS ET ADORABLES FILLES Amira et Alaa.

A MES CHERS FRERES Karim, Walid et Mohamed et MES CHERS BELLES SOEURS Amel et Nesrine vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A MES CHERS BEAUX PARENTS : En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

Un Dédicace pour tous mes amis.

UNE SPECIALE DEDICACE A CETTE PERSONNE QUI COMPTE ENORMEMENT POUR MOI, ET POUR QUI JE PORTE BEAUCOUP DE TENDRESSE ET DE RESPECT.  
A TOI MA FEMME YAMINA

## ملخص

الفطريات الممرضة للنبات الخيطية هي المسؤولة عن تدهور المنتجات الغذائية المختلفة، مثل الفواكه أو الخضار، مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة. كما أنها قادرة على إنتاج العديد من السموم الفطرية في النباتات والفواكه المصابة، مما يشكل خطرًا كبيرًا على صحة الإنسان والحيوان. تعتبر بكتيريا حمض اللاكتيك مضادات طبيعية لهذه الكائنات الحية الدقيقة الخطيرة، وذلك بفضل إنتاج عدد كبير من المركبات ذات الخصائص المضادة للفطريات.

في هذه الدراسة، تم اختبار 45 سلالة من بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الماعز والأبقار والإبل الخام من مناطق مختلفة من الجزائر، قد خضعوا لتحديد النمط الظاهري والجيني، من أجل نشاطها المضاد للفطريات ضد خمس سلالات من الفطريات الممرضة للنباتات والسموم والمتدهورة، وأوراق وجذور وثمار الطماطم والجزر بطرق المواجهة وطريقة الأبار حيث تم اختيار 16 سلالة بكتيرية ذات خصائص مضادة للفطريات. أظهرت دراسة الطبيعة الكيميائية الحيوية للأيضات أن هذه المستقبلات مستقرة في درجة الحرارة، والحفاظ على الطبيعة مع معالجة الإنزيمات المحللة للبروتين مثل البيبسين، والليزوزيم، والتريبسين، ويزداد نشاطها مع زيادة الرقم الهيدروجيني لمركز الاستزراع. لم يلاحظ أي فقد في النشاط المضاد للفطريات لـ 5 سلالات مختارة بعد معالجة المستقبلات عن طريق التسخين عند 4 درجات مئوية، 30 درجة مئوية، 45 درجة مئوية، 90 درجة مئوية.

تم استخدام تحليل تفاعل البوليميراز المتسلسل للفاصل الداخلي المنسوخ (ITS-PCR) وتسلسل 16S rDNA لتوصيف وتحديد عزلات BL التي أظهرت مستويات مختلفة من تثبيط نمو الفطريات. سلالتان من BL، تم تحديدهما على أنهما *Enterococcus lactis* و *E. faecium*، كان لهما أقوى نشاط مضاد للفطريات، مما يشير إلى التطبيق المحتمل في تكنولوجيا الغذاء كمواد حافظة بيولوجية ضد الفطريات المسببة للأمراض النباتية وتغيير الغذاء.

## الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض اللاكتيك؛ *Alternaria alternata*؛ فاصل داخلي مكتوب مضاد؛ الفطريات الممرضة للنبات؛ حفظ الأغذية؛ حليب الخام؛ جزر وطماطم.

## **Summray**

Phytopathogenic filamentous fungi are responsible for spoilage of various food products, such as fruits or vegetables, causing significant economic losses. They are also able to produce several mycotoxins in infected plants and fruits, representing a serious risk for human and livestock health. Lactic acid bacteria (LAB) are considered natural antagonists of these dangerous microorganisms, thanks to the production of a large number of compounds with antifungal properties.

In the present study, 45 strains of LAB isolated from raw goat, cow and camel milk from various regions of Algeria, have undergone a phenotypic and genotypic identification, were tested for their antifungal activity against five strains of the phytopathogenic, toxigenic and deteriorating fungal species. *Alternaria alternata*, isolated from the stems, leaves, roots and fruits of tomatoes and carrots, by the confrontation methods and the well method, where 16 bacterial strains with strong antifungal characteristics were selected.

A study of the biochemical nature of the metabolites has shown that these metabolites are temperature stable, and do not alter their nature with the treatment of proteolytic enzymes such as Pepsin, Lysozyme, and Trypsin, and their activity increases with increasing pH of the culture centre. No loss of antifungal activity of 5 selected strains was observed after treatment of metabolites by heating at 4°C, 30°C, 45°C, 90°C.

Internal transcribed spacer polymerase chain reaction (ITS-PCR) analysis and 16S rDNA sequencing were used to characterize and identify the LAB isolates that showed various levels of inhibition of fungal growth. Two LAB strains, identified as *Enterococcus lactis* and *E. faecium*, had the strongest antifungal activity, suggesting a potential application in food technology as bio-preservatives against phytopathogenic and food-spoilage fungi.

## **Keywords**

lactic acid bacteria; *Alternaria alternata*; internal transcribed spacer; antifungal; phytopathogenic fungi; food preservation; Raw milk; carrot and tomato

## Résumé

Les champignons filamenteux phytopathogènes sont responsables de la détérioration de divers produits alimentaires, tels que les fruits ou les légumes, entraînant des pertes économiques importantes. Ils sont également capables de produire plusieurs mycotoxines dans les plantes et les fruits infectés, ce qui représente un risque sérieux pour la santé humaine et animale. Les bactéries lactiques (BL) sont considérées comme des antagonistes naturels de ces microorganismes dangereux, grâce à la production d'un grand nombre de composés aux propriétés antifongiques.

Dans la présente étude, 45 souches de BL isolées à partir de lait cru de chèvre, vache et de chamelle de diverses régions d'Algérie, ont subi une identification phénotypique et génotypique. Elles ont été testées pour leur activité antifongique contre cinq souches de l'espèce fongique phytopathogène, toxigène et détériorante *Alternaria alternata*, isolées des tiges, de feuilles, de racines et de fruits de tomates et de carottes, par les méthodes de confrontation. Nous avons pu sélectionner 16 souches bactériennes ayant un fort caractère antifongique, en utilisant la technique d'antagonisme, et par la méthode des puits de cinq souches de BL contre 4 souches d'*Alternaria alternata*. Une étude de la nature biochimique des métabolites a montré que ces métabolites sont stables à la température, et gardent la nature des métabolites avec le traitement par des enzymes protéolytiques tels que la Pepsine, Lysozyme et la Trypsine, ainsi leur activité augmente avec l'augmentation du pH du milieu de culture. Aucune perte d'activité antifongique des cinq souches sélectionnées n'a été observée après traitement des métabolites par chauffage à 4°C, 30°C, 45°C et 90°C.

L'analyse de réaction en chaîne de polymérase d'espacement transcrit interne (ITS-PCR) et le séquençage de l'ADNr 16S ont été utilisés pour caractériser et identifier les isolats de BL qui ont montré divers niveaux d'inhibition de la croissance fongique. Deux souches de BL, identifiées comme *Enterococcus lactis* et *E. faecium*, avaient la plus forte activité antifongique, suggérant une application potentielle dans la technologie alimentaire en tant que bio-conservateurs contre les champignons phytopathogènes et altérant les aliments.

## Mots clés

Bactéries lactiques; *Alternaria alternata*; espaceur interne transcrit; activité antifongique; champignons phytopathogènes; conservation des aliments; Lait cru; carotte et tomate

## Liste des Abréviations

**A.:** *Alternaria*

**ALT:** *Alternaria*

**ADH:** Arginine Dihydrolase.

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**ADNr:** Acide désoxyribonucléique ribosomique

**ADNr 5,8S:** Sous-unité 5,8S Acide désoxyribonucléique ribosomique

**ARN:** Acide ribonucléique

**ARNr 16S:** Sous-unité 16S de l'ARN ribosomique

**ARNr:** Acide ribonucléique ribosomique

**BET:** Bromure d'ethidium

**BL:** Bactéries Lactiques.

**C.:** *Candida*.

**CaCO<sub>3</sub>:** Carbonate de Calcium.

**CO<sub>2</sub>:** Dioxyde de Carbone.

**CZP:** Czapek

**Da:** Dalton

**DLC:** date limite de consommation.

**E.:** *Enterococcus*

**EDTA:** ethylene diamine tetra acetic acid

**f. sp.:** Forme spéciale

**F.:** *Fusarium*

**FAO:** Organisation mondiale pour l'alimentation et l'agriculture.

**Fig:** Figure

**GRAS:** Generally Recognized as Safe

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène

**ITS:** espaceur interne transcrit des gènes d'ADNr (Internal Transcribed Spacer)

**kDa:** Kilodalton

**KMK:** Kempler Mac Kay.

**Lb.:** *Lactobacillus*

**Lc:** *Lactococcus*

**MEA:** Malt Extract Agar

**MH:** Muller Hinton

**MRS:** Milieu de Man, Rogosa and Sharpe

**MRS-BCP:** Milieu MRS additionné de Pourpre de Bromocrésol.

**MRSEV-BCP:** Milieu MRS sans extrait de viande additionné de Pourpre de Bromocrésol.

**MSE:** MayeuxSandine et Eliket.

**nm:** Nanomètre

**OMA:** Oatmeal, Malt, Agar

**P.:** *Penicillium*.

**PAGE:** PolyAcrylamid Gel Electrophoresis

**Pb:** paire de bases

**Pc.:** *Pediococcus*.

**PCR:** Amplification *in vitro* de l'ADN (polymerase chain reaction)

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**Phenol-chlo:** Phénol Chloroforme

**Pka:** constante acide de dissociation

**Pm:** poids moléculaire

**rpm:** Révolution par minute

**S.:** *Saccharomyces*.

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**Sp.:** espèce.

**St.:** *Streptococcus*.

**Subsp:** Sous espèce

**Tab:** Tableau

**TAE:** Tampon Tris-EDTA, acide acétique

**TBE:** Tampon Tris-EDTA, acide borique

**TE:** Tampon d'extraction

**Tris:** Trishydroxyméthylaminométhane.

**U.P:** Ultra Pure

**UFC:** Unité formant colonie

**UV:** Ultrat-Violet

**v/v:** Rapport volume à volume

**W:** *Weissella*

**w/v:** Rapport masse à volume

**Xg:** Force centrifuge

**µg:** Microgramme

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 01:</b> Classification des grands groupes des bactéries lactiques.	05
<b>Tableau 02:</b> Métabolites de différents genres de bactéries lactiques à caractères antifongiques et leurs cibles.	16
<b>Tableau 03:</b> Date de collecte, et nombre des échantillons de lait cru et leur Régions	41
<b>Tableau 04:</b> Différentes régions géographiques d'échantillonnage.	52
<b>Tableau 05:</b> Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées du lait cru de vache, de chèvre et de chamelle algérien.	71
<b>Tableau 06:</b> Nombre de bandes obtenues après amplification de l'ADNr de l'ITS et leur poids moléculaire.	73
<b>Tableau 07:</b> Représentatifs des bactéries lactiques identifiées par séquençage partiel de l'ADNr 16S et leurs pourcentages de similarités.	77
<b>Tableau 08:</b> Diamètre des colonies d' <i>Alternaria alternata</i> et la couleur dans les quatre différents milieux de culture.	84
<b>Tableau 09:</b> Souches fongiques isolées et leur pourcentage de similarité.	88
<b>Tableau 10:</b> Activité antifongique de 16 souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vache, de chèvre et de chamelle contre cinq souches d' <i>A. Alternata</i> .	90

## Liste des figures

- Figure 01:** Voies Homofermentaire et Hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques. Les enzymes sont indiquées en rouge et les enzymes limitantes sont encadrées. Les produits issus de ces réactions sont entourés en bleu. 04
- Figure 02:** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et comparaison par rapport aux genres *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus*. Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences du gène codon d'ARNr 16S. 07
- Figure 03:** Utilisations et le fonctionnement des ingrédients des bactéries lactiques. 09
- Figure 04:** diversité de composés antifongiques produits par les bactéries lactiques antifongiques. 11
- Figure 05:** Les symptômes causés par *Alternaria* spp. (A) Stand d'*A. Alternata* conidiophores avec des chaînes de conidies. (B) Les conidies en germination d'*A. Alternata* f.sp. *citri*, l'agent causal de la tache brune, infectant une feuille d'agrumes. (C) Tache noire sur la pomme de terre causée par *A. solani*. (D) Symptôme typique de « point cible » d'*Alternaria*: une série des anneaux concentriques sur le site d'attaque. (E) *A. brassicicola* sur une feuille sensible d'*Arabidopsis*. (F) développer des chaînes de conidies *A. brassicicola* à la surface d'une feuille d'*Arabidopsis* inoculée. (G) Conidies d'*A. Brassicicola* avec septa longitudinaux et transversaux (phaeodictyospores). 23
- Figure 06:** Branche de tomate: (a) tige, (b) stipule, (c) feuille composée, (d) fleurs, (e) tomate (baie). 25
- Figure 07:** Plant de carotte adulte. Reproduction d'une peinture du botaniste suédois, extraite de son livre 'Bilder ur Nordens Flora' (1901-1905). 26
- Figure 08:** Symptôme de l'alternariose : des taches foliaires de tomate sur la feuille (A, B, C), la tige (D), et le fruit (E) provoquées par *Alternaria*. 29
- Figure 09:** Développement et symptômes de maladies causées par *Alternaria* spp. 31
- Figure 10 :** *Alternaria alternata*: portions de spore en amas. La figure identifie les différents développements de spores et de conidiophores. EGS 34-016. Barres de 50 mm. Copyright des dessins au trait par E.G. Simmons. 34
- Figure 11:** Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments. 37
- Figure 12:** Échantillonnage à partir de lait cru de chamelle, de chèvre, et de vache (Photos prise par l'auteur). Période (2014-2015). 42
- Figure 13:** Protocole d'isolement et dénombrement des bactéries lactiques. 43

<b>Figure 14:</b> Différentes étapes suivies durant l'extraction d'ADN, et l'électrophorèse sur gel d'agarose.	50
<b>Figure 15:</b> Échantillonnage à partir des plantes de tomate et carotte présentant des symptômes de la maladie d' <i>Alternaria</i> (Photos prise par l'auteur). Période (2014-2015).	53
<b>Figure 16:</b> Isolement à partir de la plante de carotte présentant des symptômes sur milieu PDA. (a) feuilles, (b) racines.	55
<b>Figure 17:</b> Isolement à partir de plante tomate présentant des symptômes sur milieu PDA à partir de: (a) fruits, (b) tiges, (c) feuilles, (d) racines.	56
<b>Figure 18:</b> Schéma du protocole de la conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à l'aide de cryobilles.	58
<b>Figure 19:</b> L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaire dans la région d'ADNr et la localisation des ITS1 et ITS4.	62
<b>Figure 20:</b> Schéma démonstratif de la méthode de confrontation directe.	63
<b>Figure 21:</b> Observation macroscopique des souches des BL purifiées sur milieu MRS gélosé.	67
<b>Figure 22:</b> Observation macroscopique des souches des BL purifiées avec l'apparition d'un halo clair cultivées sur milieu MRS liquide.	67
<b>Figure 23:</b> Coloration de Gram et Observation microscopique des souches des BL purifiées sur milieu MRS solide et liquide au grossissement 100.	68
<b>Figure 24:</b> Profils ITS-PCR de 16 souches LAB qui ont montré une activité antifongique.	72
<b>Figures 25:</b> Extrait du chromatogramme du début de nucléotides présentant les mauvais pics de la séquence Forward de la souche BL35	74
<b>Figures 26:</b> Extrait du chromatogramme du centre de la séquence Forward de la souche BL35 (meilleurs pics)	74
<b>Figures 27:</b> Extrait du chromatogramme de la fin de la séquence Forward (présence de mauvais pics) de la souche BL35.	75
<b>Figure 28:</b> Exemple de résultats obtenu en utilisant le service FASTA33 sur le site des séquences des gènes ADNr 16S.	76

<b>Figure 29:</b> Arbre phylogéniques basé sur les séquences d'ADNr 16S des souches d' <i>Enterococcus faecium</i> et d' <i>Enterococcus lactis</i> , établi avec la méthode « Maximum likelihood » sur le logiciel MEGA7,0 (1000 simulations Bootstrap). Les chiffres près des branches montrent les pourcentages de bootstrap.	78
<b>Figure 30:</b> Isolement du champignon à partir de la plante de la carotte.	79
<b>Figure 31:</b> Isolement du champignon à partir de la plante de la tomate.	79
<b>Figure 32:</b> Observations macroscopiques d' <i>Alternaria alternata</i> cultivé sur milieu PDA.	80
<b>Figure 33:</b> Observations microscopiques du mycélium cloisonné et des différentes conidies produites par les espèces d' <i>Alternaria alternata</i> , macroconidies, microconidies, et chlamydospores.	81
<b>Figure 34:</b> Aspect de colonie d' <i>Alternaria alternata</i> sur les quatre différents milieux de culture après 5 jours d'incubation.	82
<b>Figure 35:</b> Observation microscopique (Microscope STEREO) d' <i>Alternaria alternata</i> 32 MA sur quatre différents milieux de culture après 5 jours d'incubation au grossissement X8.	83
<b>Figure 36:</b> Gel d'amplification d'ADN ITS d' <i>Alternaria</i> utilisant la paire d'amorces ITS1 / ITS4.	85
<b>Figures 37:</b> Extrait du chromatogramme du centre de la séquence Forward de la souche <i>Alternaria alternata</i> 17MM (meilleurs piques).	86
<b>Figure 38:</b> Exemple de résultats obtenu en utilisant le service FASTA33 sur le site des séquences des gènes ADNr 5.8S.	87
<b>Figure 39:</b> Test de l'Activité antifongique des BL contre <i>Alternaria alternata</i> par la méthode de confrontation.	89
<b>Figure 40:</b> Inhibition de cinq souches phytopathogènes d' <i>Alternaria alternata</i> par 16 souches de bactéries lactiques.	91
<b>Figure 41:</b> Activité antifongique de 5 souches de BL contre <i>Alternaria alternata</i> par la méthode des puits.	92
<b>Figure 42:</b> Inhibition de quatre souches phytopathogènes d' <i>Alternaria alternata</i> par les métabolites de cinq souches de bactéries lactiques.	92
<b>Figure 43:</b> Evaluation de l'effet de la température sur les substances antifongiques.	93
<b>Figure 44:</b> Effet des enzymes protéolytique sur les substances antifongiques.	94
<b>Figure 45:</b> Effet du pH de milieu sur les substances antifongiques.	95

## Table des matières

Remerciements

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Table des matières

Introduction..... 1

### CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les bactéries lactiques.....	3
1.1 Généralité.....	3
1.2 Méthode d'identification des bactéries lactiques.....	7
1.3 Les bactéries lactiques et la sécurité alimentaire.....	8
1.4 La recherche de l'activité anti fongique.....	10
1.5 Les souches des bactéries lactiques à caractère antifongique .....	10
1.6 Les composés antifongiques.....	11
1.6.1 Les acides organiques.....	12
1.6.2 Le peroxyde d'hydrogène.....	12
1.6.3 Le dioxyde de carbone.....	13
1.6.4 Les acides gras.....	13
1.6.5 Les bactériocine.....	13
1.6.6 Diacétyle.....	15
1.6.7 La reutérine.....	15
1.7 La biopréservation.....	18
2 Le parasite.....	19
2.1 Généralité sur le genre <i>Alternaria</i> .....	19
2.2 Historique de la taxonomie d' <i>Alternaria</i> .....	20
2.3 Classification du genre <i>Alternaria</i> .....	21
2.4 <i>Alternaria alternata</i> .....	23
2.5 La plante hôte.....	24
2.5.1 La Tomate.....	24
2.5.2 La Carotte.....	25
2.6 Alternariose (brulure précoce) .....	26
2.7 Dégâts de la maladie.....	27
2.8 Symptômologie.....	28
2.9 Cycle vital.....	30
2.9.1 La conservation, source d'inoculum.....	32

2.9.2 Pénétration et invasion.....	32
2.9.3 Sporulation et dissémination.....	32
2.10 Méthodes d'identification des champignons.....	32
2.10.1 Identification morphologique.....	33
2.10.1.1 Caractères culturels.....	33
2.10.1.1 Caractères morphologiques.....	33
<i>a-Aspect macroscopique</i> .....	33
<i>b-Aspect microscopique</i> .....	33
2.10.2 Identification génétique.....	34
2.11. Les <i>Alternaria</i> producteurs de métabolite secondaire.....	35
2.11.1 Les mycotoxines.....	35
2.11.2 Présence de mycotoxines d' <i>Alternaria</i> , et <i>Alternaria</i> dans les aliments.....	36
2.11.3 Les mycotoxines et les bactéries lactiques.....	37
2.12 La lutte contre <i>Aternaria</i> .....	38
2.12.1 Lutte biologique.....	39

## **Chapitre II : MATERIELS ET METHODES**

1 Les bactéries lactiques.....	41
1.1 Provenance des échantillons.....	41
1.2 Isolement et dénombrement des bactéries lactiques.....	42
1.3 La conservation des bactéries lactiques.....	43
1.3.1 La conservation à courte terme.....	43
1.3.2 La conservation à long terme.....	43
1.4 Identifications des isolats.....	44
1.4.1 La coloration de Gram.....	44
1.4.2 Caractérisation biochimique et physiologique.....	44
1.4.2.1 Recherche de la Catalase.....	44
1.4.2.2 La croissance en présence de NaCl (4% et 6,5%).....	44
1.4.2.3 La croissance à pH alcalin et acide.....	45
1.4.2.4 La thermorésistance.....	45
1.4.2.5 La recherche de l'Arginine Dihydrolase (ADH).....	45
1.4.2.7 Détermination du type fermentaire.....	45
1.4.2.8 Détermination de l'espèce.....	46
a-Profil fermentaire des carbohydrates.....	46
b- Caractérisation technologique.....	46
b-1 Production des composés aromatiques.....	46
b-2 Production de dextrane.....	47
b-3 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose).....	47
1.5 Caractérisation moléculaire des souches bactériennes.....	47
1.5.1 Extraction de l'ADN génomique des souches bactériennes sélectionnées.....	47
1.5.2 Vérification qualitative d'extrait d'ADN.....	48
1.5.3 Analyse d'espaces internes transcrits (ITS-PCR).....	48
1.5.4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	49
1.5.5 Préparation du gel d'agarose (annexe 2).....	49

1.5.6 Dépôt des échantillons (produits d'amplification).....	49
1.5.6.1 Migration.....	49
1.5.6.2 Visualisation.....	49
1.5.7 Identification des isolats de LAB par séquençage partiel de l'ADNr 16S et analyses phylogénétiques.....	51
1.5.8 Traitement et analyse phylogénétique des séquences.....	51
1.5.9 Nettoyage et assemblage des séquences.....	51
1.5.10 L'alignement et analyse bio-informatique des séquences d'ADN.....	51
1.5.11 Analyse phylogénétique.....	52
2 Le parasite.....	52
2.1 Provenance des échantillons et échantillonnage.....	52
2.2 Isolement et purification de l'agent pathogène.....	54
2.3 Culture monospore ou clonage.....	57
2.4 Repiquage du champignon.....	57
2.5 Conservation des isolats.....	57
2.6 Identification des isolats d' <i>Alternaria</i> .....	58
2.6.1 Etude des caractères cultureux et identification morphologique.....	58
a- <i>Etudes des caractères morphologiques macroscopiques</i> .....	58
b- <i>Etudes des caractères microscopiques d'Alternaria</i> .....	59
2.7 Caractérisation moléculaire des souches fongique.....	60
2.7.1 Extraction de l'ADN génomique des souches fongiques.....	60
2.7.2 Amplification de la région ITS (espaceur interne transcrit).....	61
2.7.3 Identification des souches fongiques par séquençage partiel de l'ADNr 5.8S et analyses phylogénétiques.....	61
2.7.4 Numéros d'accèsion de séquence nucléotidique.....	62
2.8 Test d'activité antifongique.....	62
2.9 Caractérisation des métabolites antifongiques.....	63
2.9.1 L'effet de la température.....	63
2.9.2 L'effet du pH.....	64
2.9.3 L'effet des enzymes protéolytiques.....	64

### **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

1 Caractérisation phénotypique des isolats bactériens.....	66
1.1 Etude de l'aspect macroscopique desisolats.....	66
1.2 Etude de l'aspect microscopique des isolats.....	67
1.3 Croissance en présence de NaCl (4% et 6,5%) et pH (4,8 et 9,6) .....	68
1.4 La croissance à différentes températures.....	69
1.4 Recherche de l'Arginine Dihydrolase (ADH).....	69
1.6 Hydrolyse de l'esculine .....	69
1.7 Type fermentaire.....	69
1.8 Profil fermentaire des carbohydrates .....	69
1.9 La production de dextrans.....	69
1.10 L'utilisation de citrate.....	69
2 Identification moléculaire des souches bactériennes.....	71

2.1 Traitement et analyse phylogénétique des séquences.....	73
2.2 Analyse des séquences par le Blast et/ou FASTA33.....	75
2.3 Elaboration d'arbres phylogéniques.....	77
3 Isolement et identification d' <i>Alternaria alternata</i> .....	78
3.1 Isolement des microorganismes à partir des plantes de tomate et de carotte.....	78
3.2 Identification des isolats.....	79
3.2.1 Caractères morphologiques.....	79
3.2.2 Identification microscopique.....	80
4 Effet des différents milieux de culture.....	81
5 Identification et caractérisation moléculaire d' <i>Alternaria alternata</i> .....	84
5.1 Traitement et analyse phylogénétique des séquences.....	85
5.2 Analyse des séquences par Blast et/ou FASTA33.....	86
6 La recherche de l'activité antifongique .....	88
6.1 Méthode de confrontation.....	88
6.2 Méthode des puits.....	91
7 Caractérisation des métabolites antifongiques.....	93
7.1 L'effet de la température.....	93
7.2 L'effet des enzymes protéolytiques .....	93
7.3 L'effet du pH.....	95
<b>Discussion générale</b> .....	96
<b>Conclusion</b> .....	104
<b>Perspective</b> .....	105
<b>Références bibliographiques</b> .....	106
<b>Annexe</b>	

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Divers produits alimentaires peuvent être contaminés par une large gamme de champignons filamenteux, entraînant des pertes économiques importantes (Sadiq *et al.*, 2019). En plus de la détérioration des aliments, la contamination fongique représente un risque sérieux pour la santé humaine puisque les souches de certains genres tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Fusarium* sont capables de produire des métabolites secondaires toxiques appelés mycotoxines (Salas *et al.*, 2018). *Alternaria alternata* est l'espèce la plus commune du genre *Alternaria* dans les fruits et légumes récoltés et l'espèce la plus importante produisant des mycotoxines (Lee *et al.*, 2015). Les espèces *Alternaria* sont connues pour être capables de produire plus de 70 phytotoxines, mais seules quelques-unes ont été caractérisées chimiquement et agissent comme des mycotoxines pour les humains et les animaux (EFSA, 2011). Certaines toxines telles que l'alternariol (AOH), l'alternariol monométhyléther (AME), l'acide ténazonique (TeA) et les altertoxines (ATX) ont été décrites pour induire des effets nocifs chez les animaux, y compris des effets tototoxiques et tératogènes (EFSA, 2011). Chez *A. alternata* sept pathotypes différents ont été identifiés pour produire des toxines sélectives ou spécifiques à l'hôte (HST) (Tsuge *et al.*, 2013). Les HST sont des métabolites secondaires qui ne causent des dommages qu'à l'hôte sensible et sont libérés pendant la germination des conidies, avant la pénétration tissulaire et la production de mycélium (Tsuge *et al.*, 2013). En raison de leur croissance même à basse température, les espèces *Alternaria* sont responsables de la détérioration des produits alimentaires pendant le transport et le stockage réfrigéré (EFSA, 2011).

Ces dernières années, un intérêt croissant a été montré pour la biopréservation, c'est-à-dire l'utilisation de micro-organismes ou de leurs métabolites antimicrobiens dans la conservation des aliments, en raison de la demande des consommateurs pour une utilisation réduite des produits chimiques dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux en raison de leurs risques pour la santé, tels que l'indigestibilité ou les allergies (Salas *et al.*, 2018).

Les bactéries lactiques (BL) sont connues pour avoir un large spectre de propriétés antimicrobiennes. Ils sont reconnus comme probiotiques et sont largement utilisées dans la fermentation alimentaire depuis longtemps. Ce processus contribue à la sécurité, la stabilité, la saveur et la structure des aliments. En tant qu'additifs alimentaires, les bactéries lactiques améliorent la sécurité microbiologique des produits sans altérer négativement les caractéristiques sensorielles des aliments.

À ce jour, les bactéries lactiques sont considérées comme les meilleurs candidats pour la protection d'une large gamme de produits alimentaires contre les champignons d'altération (**Sadiq et al., 2019**). Ces microorganismes peuvent inhiber la croissance fongique ou la prolifération des spores dans les aliments en raison de la production de plusieurs composés antifongiques tels que les acides organiques, les acides gras, les acides carboxyliques, les lactones, les alcools, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle, le CO<sub>2</sub>, les bactériocines, les composés protéiques ou les dipeptides cycliques (**Crowley et al., 2013**). Lorsque les mycotoxines sont déjà produites par des champignons dans les aliments, les bactéries lactiques peuvent dégrader ou réduire leur contenu grâce à divers mécanismes, notamment l'adsorption sur la paroi cellulaire et la biodégradation (**Sadiq et al., 2019**). Il existe une connaissance approfondie des effets antagonistes des bactéries lactiques sur les champignons mycotoxigènes associés à la contamination des aliments, mais les études se sont concentrées spécifiquement sur les espèces *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (**Salas et al., 2018**), alors que le nombre d'études publiées sur l'inhibition des bactéries lactiques du genre *Alternaria* sont rares (**Belkacem et al., 2014 ; Bartkiene et al., 2019**).

Au cours des dernières années, le besoin du public pour des aliments de haute qualité sans ajout de conservateurs chimiques a déterminé la recherche de nouvelles souches bactéries lactiques capables de contrôler la croissance fongique d'espèces phytopathogènes et mycotoxigènes. En raison des études limitées sur l'activité antifongique des bactéries lactiques contre les espèces d'*Alternaria*.

L'objectif de cette recherche est de tester si les souches de bactéries lactiques isolées à partir de divers échantillons de lait collectés dans trois régions d'Algérie (Bechar, Oran et Relizane) peuvent posséder la propriété d'inhibition de la croissance des souches d'*A. alternata*, et ce dans l'objectif d'utiliser ces microorganismes dans la conservation de certains produits alimentaires périssables telles que les fruits et légumes et également mettre en évidence les métabolites antifongiques. Dans cette étude, nous avons envisagé l'isolement, la caractérisation et l'identification des souches d'*Alternaria* et des souches de bactéries lactiques aux propriétés antifongiques.

Cette thèse est composée de trois chapitres, le premier est consacré à en une étude bibliographique rappelant les bactéries lactiques, la recherche de l'activité antifongique, la biopréservation, et enfin le parasite; par ailleurs, le deuxième est consacré à la méthodologie et les différents matériels et techniques utilisés, enfin le troisième traite les résultats et discussion.

# **CHAPITRE I**

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUES**

## CHAPITRE I: Étude bibliographique

### 1. Les bactéries lactiques

#### 1.1 Généralités

L'essor des bactéries lactiques a bénéficié de celui des grands mammifères, producteurs de lait, commencé il y a 65 millions d'années. Il s'est accentué lorsque l'homme est passé du statut de chasseur-cueilleur à celui d'éleveur, il y a environ 8000 ans avant J.-C. Les premiers vases perforés de petits trous, retrouvés sur les rives du lac de Neuf châtel, datent de 3 000 ans avant J-C (**Tailliez, 2001**).

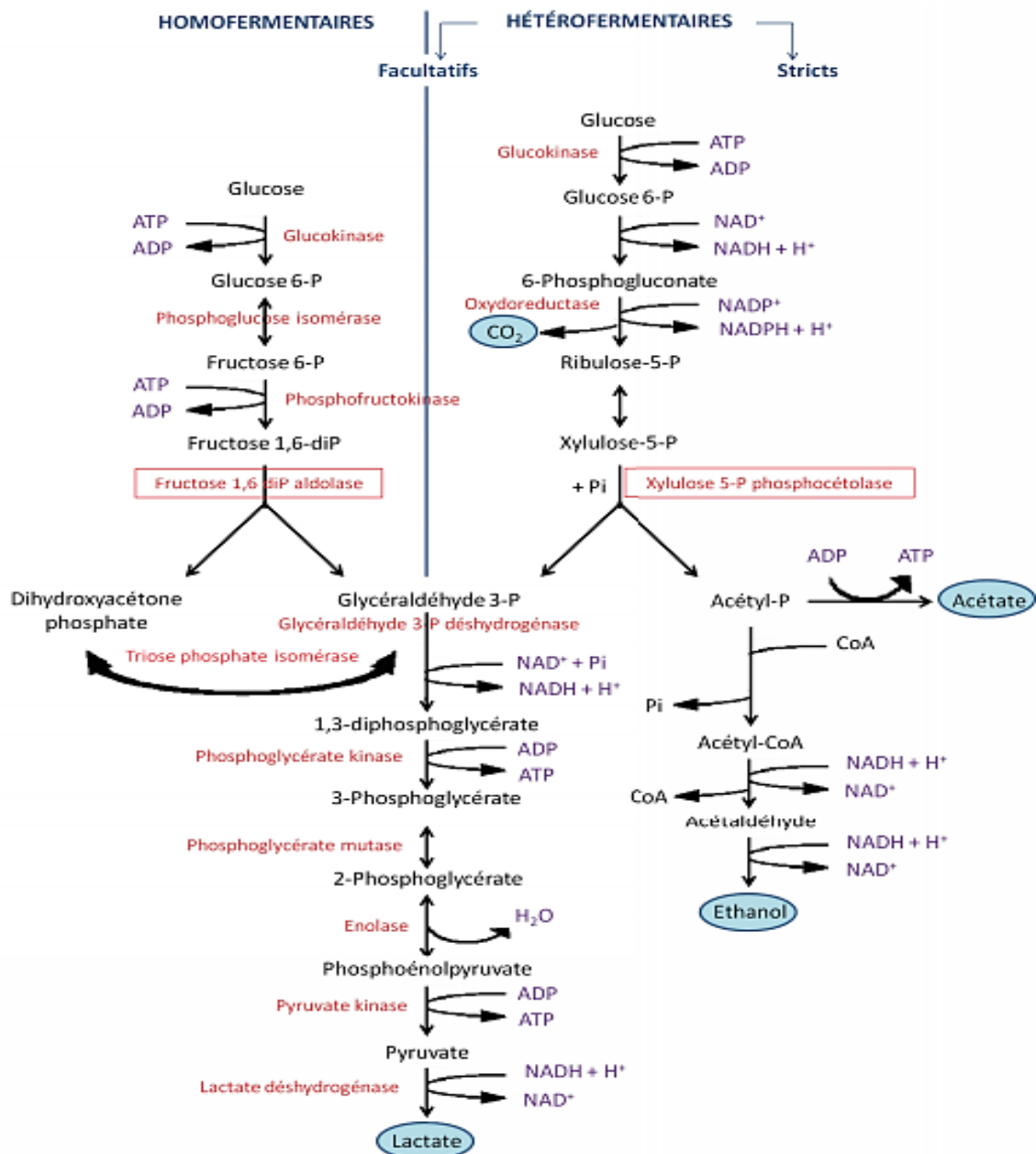
Le concept des bactéries lactiques comme un groupe d'organismes a été mis au point au début des années 1900. Les interactions des bactéries lactiques dans les aliments ont bénéficié d'une attention précoce des scientifiques et ils ont abouti à la contribution significative de Pasteur sur la fermentation d'acide lactique en 1857, suivi par le premier isolement d'une culture bactérienne pure, *Bacterium lactis*, par Lister en 1873. L'utilisation de ferments lactiques pour la production de fromage et de lait caillé a été introduite presque simultanément en 1890 par Weigmann (**Stiles et Holzappel, 1997**).

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquistes qui ont un lien étroit avec l'être humain et les animaux puisqu'elles colonisent le tractus gastro-intestinal et les muqueuses des mammifères en tant que flore intestinale (**König et Fröhlich, 2009**), de plus ils constituent la flore vaginale. Ils peuvent aussi avoir divers habitats comme le lait, fruits, légumes, peaux des animaux, eaux de mer, eau douce, poisson, viande, excréments (**Feldgarden et al., 2009**). Cependant, elles sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromage, crème etc...) (**Galvez et al., 2011**).

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, organotrophes, formant un groupe de coques et/ou des bâtonnets, Gram positif, aéro-anaérobie facultatives ou microaérophiles, immobiles, non sporulées, catalase négative et généralement nitrate réductase négative, acido-tolérante et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (**Zhang et Cai, 2014; khandakar et al., 2014; Mokoena, 2017**).

Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes, assez hétérogènes sur le plan physiologique et morphologique, qui ont une particularité de synthétiser leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides et produit de l'acide lactique (**De Roissart et Luquet, 1994**), et généralement reconnu comme des organismes sans danger (GRAS) (**khandakar et**

al., 2014). La voie métabolique du glucose peut être homofermentaire lorsque le produit terminal est l'acide lactique comme *Streptococcus* et *Lactococcus*, ou hétérofermentaire, lorsque le produit final en plus de l'acide lactique, il y a la production d'acide acétique, d'éthanol, et de gaz carbonique (**figure 01**), comme dans certaines espèces de *Lactobacillus* et *Leuconostoc*. Les bactéries montrent des exigences nutritionnelles complexes en glucides fermentescibles, en acides aminés, peptides, en vitamines et en sels.



**Figure 01:** Voies Homofermentaire et Hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques. Les enzymes sont indiquées en rouge et les enzymes limitantes sont encadrées. Les produits issus de ces réactions sont entourés en bleu (Emilie Delavenne, 2012).

Leur classifications est réalisée en fonction de leur morphologie, de leur type de fermentation et de leur température optimale de croissance (Cintas *et al.*, 2001; Quinto *et al.*, 2014; Mokoena, 2017), selon la classification taxonomique actuelle, ils appartiennent au phylum des Firmicutes , classe Bacilli, ordre Lactobacillales, incluent divers familles (Garrity *et al.*, 2004; Holzapfel et Wood, 2014; Mokoena, 2017), apparaitre de plusieurs genres : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella*, ..., (Stiles et Holzapfel, 1997; Khalid, 2011).

**Tableau 01:** Classification des grands groupes des bactéries lactiques (Stiles et Holzapfel, 1997; Carr *et al.*, 2002)

Genres	Formes	Catalase	Nitrate réductase	Fermentation	Genres bactériens
<i>Betabactérium</i>	Bacille	-	-	Hétérofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bacille	-	-	Homofermentaire	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Coque	-	-	Homofermentaire	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Betacoccus</i>	Coque	-	-	Hétérofermentaire	<i>Pediococcus</i>
<i>Tetracoccus</i>	Coque	+	+	Homofermentaire	<i>Tetragenococcus</i>

Les Lactobacilles, sont un genre de bactéries à Gram positif, fermentatifs, aérobies facultatives ou microaérophiles en forme bâtonnet mais peuvent croître dans des conditions anaérobiques. Le genre de *Lactobacillus* appartient à la famille des Lactobacillaceae, les espèces de ce genre ont généralement des formes très variés (bâtonnet, coccobacilles, ou des bacilles longs), sont souvent organisées en chainettes ou chaînes, asporulées, immobile, et catalase négative, présentent un pourcentage de GC plus large par rapport aux autres bactéries lactiques, de 32%

à 53%. Leur pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum de 5.5 à 6.2 et une température de croissance comprise généralement entre 30°C et 40°C alors que la température globale peut aller de 2°C à 53°C (De vos *et al.*, 2009; Zhang et Cai, 2014).

Les espèces du genre *Lactobacillus*, forment une partie importante du groupe de bactéries lactiques qui transforment le lactose et autres sucres en acide lactique. Ils sont présents chez les humains, dans le vagin et le tractus gastro-intestinal, vie en symbiose et constituent une petite partie de la flore intestinale.

La production de l'acide lactique, inhibe la croissance de certains microorganismes nocifs. Certaines souches de *Lactobacillus* spp et d'autres souches de bactéries lactiques peuvent posséder des propriétés thérapeutiques potentielles, y compris les anti-inflammatoires et anti-cancers, ainsi que d'autres caractéristiques d'intérêt.

Cependant, l'approche polyphasique est souvent la base de l'identification de nouvelles espèces depuis 1990 (Vandamme *et al.*, 1996), impliquant les caractéristiques génotypiques et phénotypique à la fois. Actuellement, même si leurs impacts diminuent, les séquences d'ARNr 16S en combinaison avec l'hybridation ADN-ADN restent les méthodes génotypiques de références, étayées par l'analyse de quelque test phénotypique, souvent simples, basées sur des API (Holzapfel et Wood, 2014).

*Enterococcus* est l'un des genres les plus importants des bactéries lactiques vue sa large distribution environnementale et la grande variété des niches écologiques qu'il occupe depuis les divers aliments fermentés jusqu'au tractus intestinal humain et animal dans lesquels il joue un rôle bénéfique. En étant membres habituels de la microflore intestinale, les entérocoques peuvent servir comme indicateurs de contamination fécale, chose qui est particulièrement importante en Microbiologie de la Santé publique et alimentaire. *Ent. faecalis* et *Ent. faecium* ont été soupçonnés d'être des agents causals de maladies transmises par les aliments, néanmoins, ceci n'a jamais pu être confirmé (Sephard et Gilmore, 2002).

Diverses souches de *Enterococcus* ont été employées comme probiotiques et beaucoup d'autres encore sont impliquées dans des fermentations naturelles, comme des olives de table, des produits carnés, et des produits laitiers, en particulier des fromages (Fuller, 1989; Franz *et al.*, 2003; Giraffa, 2003).

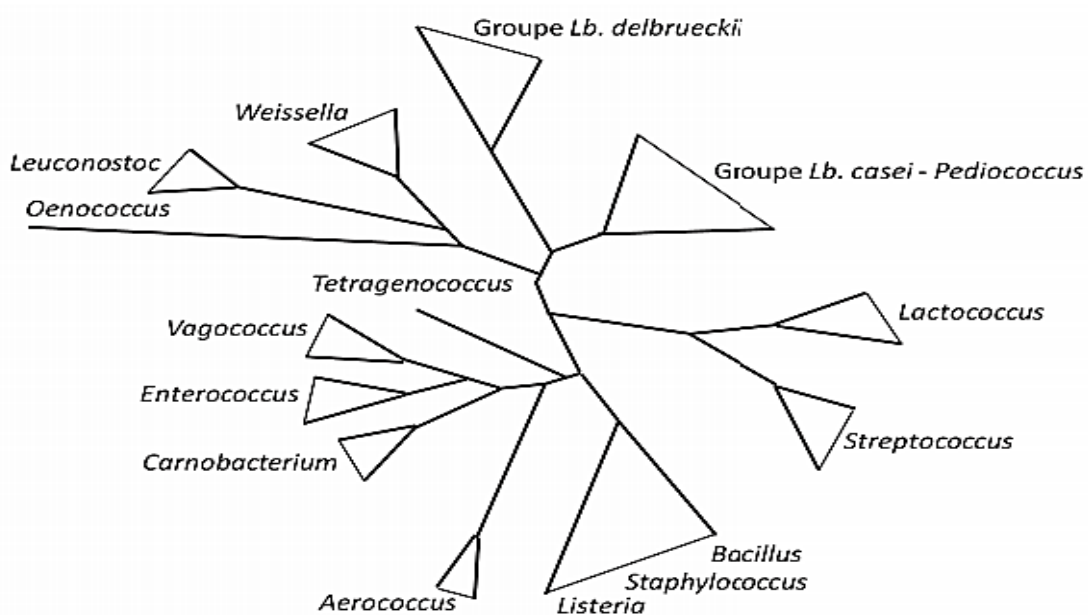
## 1.2 Méthode d'identification des bactéries lactiques

L'identification et la classification des bactéries lactiques sont complexes et ceci est d'autant plus vrai pour les Lactobacilles car les espèces au sein d'un groupe sont souvent étroitement proches.

Autrefois, les espèces du genre *Lactobacillus* étaient classées en trois grands groupes phylogénétiques (*Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*, *Pediococcus* et le groupe des *Leuconostoc* qui contenait aussi quelques Lactobacilles). Les nouvelles méthodes de classification ont permis de réévaluer ces groupes et les espèces qu'ils comprennent pour finalement aboutir aujourd'hui à une nouvelle classification comportant plus d'une dizaine de groupes (**Felis and Dellaglio, 2007; Pot, 2008**).

Avec l'évolution de la biologie moléculaire et faible discrimination des méthodes d'identification phénotypique, la taxonomie moderne des bactéries lactiques se base désormais sur une approche polyphasique par les résultats de techniques moléculaires (**Klein et al., 1998**).

Plus précisément, une taxonomie précise doit passer par plusieurs méthodes d'identification, avec ou sans mise en culture.



**Figure 02:** Arbre phylogénétique des bactéries lactiques et comparaison par rapport aux genres *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (**Axelsson, 2004**). Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences du gène codon d'ARNr 16S.

Différentes techniques phénotypiques sont utilisées pour l'identification des lactobacilles. L'observation de la morphologie et l'évaluation des profils de fermentation des glucides font partie des techniques les plus connues (**Pot, 2008**). Cependant, l'analyse des isomères de l'acide

lactique et celle de la composition du peptidoglycane de la paroi cellulaire sont aussi utilisées (Felis and Dellaglio, 2007), tout comme l'évaluation de la mobilité électrophorétique de lactate déshydrogénase ou l'analyse des protéines cellulaires par SDS-PAGE (Durlu-Ozkaya et al., 2001; Zamfir et al., 2006; Pot, 2008; Voulgari et al., 2010).

La plupart des identifications bactériennes passent désormais par l'utilisation de techniques génotypiques. L'hybridation ADN-ADN est la méthode qui présente la meilleure résolution dans l'identification et la classification des bactéries lactiques et c'est la seule méthode d'identification valable selon les recommandations du comité international pour la systématique de procaryotes. Cependant, cette méthode est coûteuse et longue à mettre en place (Emilie Delavenne, 2012).

La plupart des méthodes moléculaires ciblent le gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène, d'environ 1540 paires de bases, est composé de séquences conservées, communes à des unités de taxon élevées, et des séquences variables, spécifiques d'espèces. Les séquences conservées sont utiles pour la comparaison de bactérie phylogénétiquement éloignées tandis que les séquences variables permettent l'identification de bactéries au niveau de l'espèce, du genre, et de la famille, par comparaison avec des séquences présentes dans des bases de données. Lorsque l'alignement de séquences amplifiées donne un pourcentage d'identité inférieur à 97% on considère que les deux bactéries n'appartiennent pas à la même espèce. Il existe des amorces universelles permettant d'amplifier la quasi-totalité de ce gène pour presque toutes les Eubactéries (Emilie Delavenne, 2012).

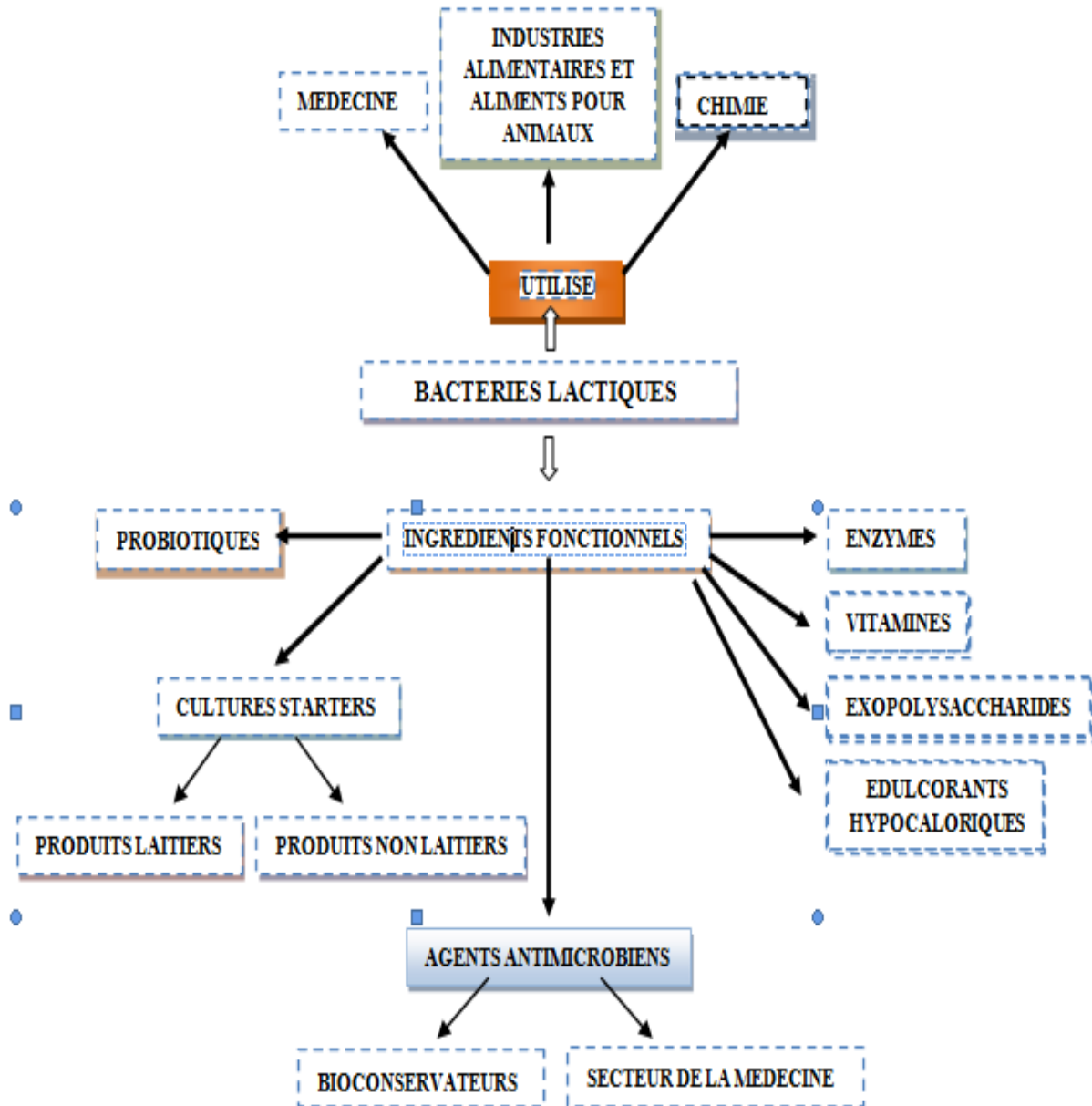
Certaines méthodes sont basées sur l'amplification d'une partie seulement de ce gène ou de la région inter génique entre ce gène et le gène codon pour l'ARNr 23S. Il existe notamment des amorces spécifiques permettant l'amplification d'un fragment de l'ADNr 16S uniquement pour l'espèce ou le genre cible.

L'identification basée uniquement sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ne semble à ce jour plus suffisamment fiable pour identifier les espèces du genre *Lactobacillus* (Emilie Delavenne, 2012).

### 1.3 Les bactéries lactiques et la sécurité alimentaire

Les bactéries lactiques sont bien tolérées par l'Homme et les animaux ayant le statut GRAS (Generally Reconized As Safe), constituent un groupe bactérien largement utilisé dans

l'industrie alimentaire (**figure 03**) dont les principaux genres utilisés sont *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Carr *et al.*, 2002).



**Figure 03:** Utilisations et le fonctionnement des ingrédients des bactéries lactiques (Florou-Paneri *et al.*, 2013; Merzouk, 2015)

#### 1.4 La recherche de l'activité anti fongique

La recherche de souches lactiques à caractère antifongique se fait par la méthode de confrontation directe et indirecte, la méthode de 96 puits ou bien de diffusion en gélose, et souvent par la méthode de double couche en premier lieu.

La confrontation par contact directe, consiste à déposer une bouture de champignon de diamètre précis, dans la même boîte de Petriensemencée préalablement par la bactérie, et contenant un milieu favorable à la croissance bactérienne et fongique. Cette méthode consiste à évaluer la croissance du champignon par mesure de diamètre, après une incubation permettant la croissance du champignon (Gerbaldo *et al.*, 2012). Dans la méthode de 96 puits ou de microtitrage en puits sur plaque, le surnageant, concentré ou non est stérilisé par filtration, est mélangé au milieu de culture liquide contenant les spores du champignon et déposé dans les puits. Cette méthode consiste à évaluer le pourcentage d'inhibition de la germination du champignon par mesure de DO à 550nm, après une incubation permettant la croissance du champignon (Mangnusson *et al.*, 2003). Pour la méthode de diffusion en gélose, le surnageant de culture bactérienne, concentré ou non par filtration, est déposé dans des puits creusés préalablement sur le milieu gélosé à faible dose d'agar contenant le champignon. Après incubation à une température ambiante, un halo clair se forme autour des puits pour permettre la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Mangnusson *et al.*, 2003).

La méthode de double couche consiste àensemencer deux stries d'une culture bactérienne sur milieu MRS, après incubation, 10 ml de gélose à faible pourcentage d'agar pour faciliter la diffusion, contenant des spores fongique, recouvre les stries bactériennes, puis incubé une autre fois, pour permettre aux champignons de croître, et formation d'une zone d'inhibition autour des stries (Mangnusson *et al.*, 2003).

#### 1.5 Les souches des bactéries lactiques à caractère antifongique

La recherche de bactéries lactiques antifongiques en vue de leur utilisation en tant que culture bio-protectrice nécessite que l'on tienne compte de la matrice dans laquelle on souhaite les implanter et des cibles fongiques contre lesquelles on désire lutter.

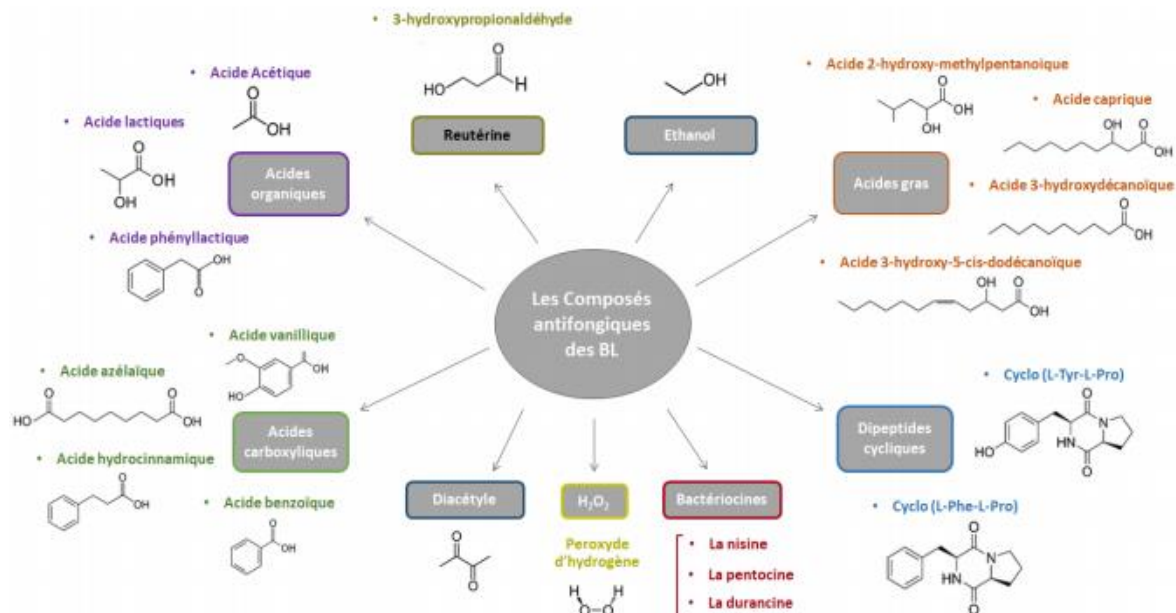
Le genre *Lactobacillus* est le plus souvent retrouvé parmi les bactéries lactiques à caractère antifongique, suivi des genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*, ainsi que des genres de *Pediococcus*, *Enterococcus* et *Weissella*, les genres *Streptococcus* et *Carnobacterium* sont les moins retrouvés (Shekh *et al.*, 2009; Valerio *et al.*, 2009; Ndagano *et al.*, 2011; Beak *et al.*, 2012). Le spectre d'activité de ces bactéries est très varié, regroupant des moisissures des genres

d'*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, et des espèces de levures telles que *Saccharomyces* et *Candida* (Djossou, 2011).

Les souches à caractère antifongique proviennent de lait de vache sont 49%, de chèvre sont de 43%, seulement 8% proviennent de lait de brebis. Le lait de vache et de chèvre est un réservoir des lactobacilles à caractère antifongique surtout en période d'été et automne, principalement *Lactobacillus plantarum* (Delavenne *et al.*, 2012).

### 1.6 Les composés antifongiques

Les recherches sur l'activité antifongique chez les bactéries lactiques n'ont commencé qu'à la fin des années 50 et au début des années 60, avec Guillo (1958) qui élaborait un produit actif contre *Candida albicans* par *Lactobacillus acidophilus*. Plusieurs équipes de recherche ont pu identifier qu'il existe de nombreuses substances synthétisées par les bactéries lactiques avec une activité antagoniste (Mokoena, 2017; Inga Bazukyan *et al.*, 2018) comme les acides organiques (Stiles *et al.*, 2002), le peroxyde d'hydrogène (khandakar *et al.*, 2014), les acides gras (Bergsson *et al.*, 2001), le dioxyde de carbone, le diacétyle, la reuterine et les bactériocines (De Vuyst et Vandamme, 1994). Outre que les métabolites antifongiques, la compétition nutritionnelle a été prouvée aussi comme un obstacle antifongique (Bayrock *et al.*, 2004).



**Figure 04:** Diversité de composés antifongiques produits par les bactéries lactiques antifongiques (adapté à Crowley *et al.*, 2013).

### 1.6.1 Les acides organiques

Les principaux métabolites antifongiques produits par les bactéries lactiques, sont les acides organiques. Parmi les acides organiques, l'acide lactique est le principal produit issu de la fermentation par les bactéries lactiques, il est majoritaire, mais aussi d'autres acides organiques principaux comme l'acide acétique (Ross *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2017), l'acide formique, propionique, caproïque, ou encore benzoïque sont également des produits des bactéries lactiques (Noda *et al.*, 1980). Ces acides faibles sont impliqués dans l'activité antimicrobienne (Caplice *et al.*, 1999),

Il existe d'autres acides impliqués dans l'activité antifongiques comme les acides carboxyliques ou des dérivés d'acides carboxyliques, produites en faible quantité et semblent agir en synergie avec l'acide lactique et l'acide acétique (Salas *et al.*, 2017). Le mélange de l'acide lactique avec une substance de masse moléculaire de 83 non identifiée, agit de manière synergique et provoque des mal formations au niveau du mycélium et conidie (Mandal *et al.*, 2013). Selon Mauche *et al.*, (2010), l'ajout de 5% de surnageant de *Lactobacillus brevis* PS1 contenant des acides organiques et des protéines, dans le milieu de culture retarde la croissance du tube germinatif de *Fusarium culmorum*, par contre l'ajout d'une quantité de 10% l'inhibe totalement.

Par ailleurs, l'acide phényllactique est un acide organique faible, faisant partie des substances antifongiques les plus étudiés (Crowley *et al.*, 2013), produit par certains espèces lactiques comprenant le genre *Lactobacillus* en parallèle avec l'acide hydroxyphényllactique, à partir de la phénylalanine, cet acide possède des propriétés antifongique (Valerio *et al.*, 2004; Corsetti et valmorri, 2011), et a été décrit comme composé actif contre diverses moisissures comme ceux du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium* (Lavermicocca *et al.*, 2003).

### 1.6.2 Le peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène, produit en croissance aérobie grâce a NADH oxydases, NADH peroxydases, pyruvate oxydase ou  $\alpha$ -glycérophosphate oxydases (Condon, 1987; Piard *et al.*, 1991). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit s'accumule dans l'environnement, peut inhiber certains microorganismes (Condon, 1987). En effet, ce composé inhibe *in vitro* la germination des moisissures, *Candida albicans* (Joseph *et al.*, 1998). L'action inhibitrice du peroxyde d'hydrogène est principalement due à son fort effet oxydant sur les lipides membranaires et les protéines cellulaire (Caplice et Fitzgerald, 1999; Strus *et al.*, 2005; Hyun Min *et al.*, 2012).

### 1.6.3 Le dioxyde de carbone

Le Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est l'un des produits résultants du métabolisme hétérofermentaire des bactéries lactiques. Le mécanisme précis de son action antimicrobienne est toujours mal compris. Cependant, le CO<sub>2</sub> peut jouer un rôle antimicrobien en créant un environnement anaérobie lors de son accumulation, provoquant le dysfonctionnement des lipides membranaire et conduit à la décarboxylation enzymatique des cellules cibles (**Eklund et al., 1984; Ammor et al., 2006**).

### 1.6.4 Les acides gras

Les acides gras jouent un rôle essentiel dans les propriétés organoleptiques (**Ganesan et al., 2004**), mais peuvent aussi avoir un rôle antifongique lorsque la quantité est suffisante (**Sjögren et al., 2003**), en s'introduisant dans les membranes fongiques grâce aux propriétés lipophiles (**Ström, 2005**).

Plusieurs études sur des acides gras à propriétés antifongique ont été réalisées ces dernières années, notamment, *Lactobacillus plantarum* MiLAB14 produit de l'acide 3-(R)-hydroxy-tétradécanoïque, 3-HYDROXY-5-cis-dodécenoïque, 3-(R)-hydroxy-dodécanoïque, 3-(R)-hydroxydécanoïque qui était actif contre plusieurs moisissures du genre *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. commune*), *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. fumigatus*), et des levures comme *Rhodotorula micilaginosa* (**Sjogren et al., 2003**).

### 1.6.5 Les bactériocine

Les bactériocines sont un groupe de peptides antimicrobiens puissants produits par certains micro-organismes, y compris BL, ayant une activité antifongique. Ces molécules sont synthétisées par les ribosomes bactériens comme métabolites primaires (**Parada et al., 2007; Zacharof et Lovitt, 2012**), libérés dans le milieu extracellulaire sous forme native, ou modifiée, à la fin de la phase exponentielle de la croissance et le début de la phase stationnaire.

Les bactériocines représentent une large classe de substances antagonistes qui varie considérablement du point de vue de leur poids moléculaire, de leurs propriétés biochimiques, de leur spectre d'action et leur mode d'action (**Klaenhammer, 1988**).

La classification des bactériocines se fait en fonction de leur structure (**Klaenhammer, 1993; O'Keefe et Hill, 1999**), dont il existe 4 classes majeurs de bactériocines produites par les bactéries lactiques, dont la classe I (lantibiotique) qui comprend des petits peptides de deux types (A et B) linéaires flexibles et globulaires. La classe II c'est des protéines à faible poids moléculaire stable à la chaleur, subdivisé en 4 sous classes. Tandis que la classe III c'est des

protéines de hauts poids moléculaire sensibles à la chaleur. La classe IV, quant à elle, dont des protéines complexes dont l'activité requiert l'association de carbohydrates ou de moitiés lipidiques (Stoyanova *et al.*, 2012). La nouvelle classification des bactériocines s'appuie sur l'évolution phylogénétique et motifs des séquences consensus des différentes bactériocines, de ce fait sont classifié en 12 groupes (Zouhir *et al.*, 2010).

Le mode d'action n'est pas encore très bien recherché, mais il existe quelques études montrent que ces peptides agir par la formation des pores membranaires, provoquant la perte du matériel intracellulaire (Dortu et Thonart, 2009), tel que la bactériocine produite par *Lactobacillus pentosus* Tv 35b de taille moyenne de 3.9 kDa (Okkers *et al.*, 1999). Les bactériocines peuvent avoir aussi d'autres effets sur la cellule cible comme la bactériocine produite par *Lactobacillus plantarum* YML007 pouvant endommager la paroi et réduire la taille des hyphes des champignons *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* (Ahmed-Rather *et al.*, 2013).

La bactériocine brevicine SG1 produite par *Lactobacillus brevis* a une activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* et *Penicillium citrium*, par une inhibition de la ramification des hyphes, réduit la longueur du tube germinatif et la biomasse (Adebayo et Aderiye, 2001).

Le Lay *et al.*, (2008), ont démontré que la nisine Z, produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719, a une activité antifongique contre *Candida albicans* par une destruction de la paroi, apparition de vacuoles qui sont larges et irrégulières, augmentation de la granulation du cytoplasme lors de la phase stationnaire et un blocage de la transformation de forme blastospore à la forme hyphe.

Les dipeptides cycliques sont aussi des substances produites par les bactéries lactiques, et qui sont des composés intermédiaires dans la production de peptide non ribosomique, présentent une activité antifongique contre plusieurs champignons (Ström *et al.*, 2002; Schwarzer *et al.*, 2003), synthétisés à faibles concentrations à l'ordre de mg/ml. La température et l'acidification ont un rôle important dans la production de dipeptide cyclique (Dal Bello *et al.*, 2007). Des études faites par Dal Bello *et al.*, (2007), ont montré que les peptides cyclo (L-Leu-L-Pro) et cyclo (L-Phe-L-Pro) produites par *Lactobacillus plantarum* FST1.7 présentait une forte activité antifongique vis-à-vis *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* et *Penicillium Roqueforti*.

Le mode d'action de l'acide lactique et l'acide phenyllactique avec le cyclo (L-Phe-L-Pro), produit par *Lactobacillus plantarum* Milab 393 contre la croissance d'*Aspergillus nidulans* j283 affectent sur la morphologie de mycélium (Strom *et al.*, 2005).

#### 1.6.6 Diacétyle

Le diacétyle (2,3-butanedione), est un produit de métabolisme du citrate, qui est responsable de l'arôme « beurre » des produits laitiers (Monnet, 2008; Karimi *et al.*, 2012). Le diacétyle est largement produit par les bactéries lactiques, notamment par des espèces du genre *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* (Thierry *et al.*, 2015). Les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures sont plus sensibles au diacétyle que les bactéries à Gram positif. Garofalo *et al.*, (2012) ont démontré que le diacétyle produit par *Lactobacillus paralimentarius* PB127 présente une activité antifongique.

#### 1.6.7 La reutérine

Ou 3-hydroxypropionaldéhyde, de la famille des bactériocines car cette molécule est non protéique, capable d'inhiber également les virus, les champignons, et les protozoaires (Caplice et Fitzgerald, 1999). Elle est produite par certains *Lactobacillus* hétérofermentaires (Shnürer et magnusson, 2005) comme *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, qui inhibe la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette molécule a été décrite par Caplice et Fitzgerald, (1999) et Vollenweides et Lacroix, (2004), comme étant capable d'inhiber l'enzyme ribonucléotide réductase, impliquée dans la biosynthèse de l'ADN, elle a un large spectre d'activité antimicrobienne, contre les bactéries à Gram négatif et quelques champignons comme *Torulopsis glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sambucinum* et *Candida albicans* (Batt et Tortorello, 2014).

**Tableau 02:** Métabolites des différents genres de bactéries lactiques à caractères antifongiques et leurs cibles

Espèces productrices typiques	Métabolites	Cibles	Références
<b>Genre <i>Lactococcus</i></b>			
<i>Lc. Lactis</i>	Nisin	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Fusarium</i> spp., <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	<b>Batish et al., 1997</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin, Lactocin, Mersacidin,	Pas de cibles définies	<b>Parada et al., 2007; Todorov, 2009; Suskovic et al., 2010; Mahrous et al., 2013</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Nisine Z	Pas de cibles définies	<b>Le Lay et al., 2008</b>
<b>Genre <i>Lactobacillus</i></b>			
<i>Lb. plantarum</i>	(S)-(-)-2-Hydroxyisocaproic, acide hydrocinnamique, acide phényllactique, acide décanoïque, acide azélaïque, acide 4-hydroxybenzoïque, acide p-coumarique, acide vanillique, acide DL-Th-hydroxyphényllactique, acide «3-hydroxydécanoïque	<i>Microsporum canis</i> , <i>Microsporum gypseum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i>	<b>Niku-Paavola et al., 1999</b>
	Acide benzoïque, 5-méthyl-2,4-imidazolidinedione, tétrahydro-4-hydroxy-4-méthyl-2H-pyran-2-one, 3-(2-méthylpropyl)-2,5-pipérazinedione, cyclo (glycyl-L-leucyle)).	<i>Fusarium avenaceum</i>	<b>Dal Bello et al., 2007</b>
	Acide lactique, PLA, cyclo (L-Leu-L-Pro), cyclo (L-Phe-L-Pro)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	<b>Lavermicocca et al., 2003</b>
	3-(R)-hydroxydécanoïque, 3-hydroxy-5-cis-dodécanoïque, 3-(R)-hydroxydodécanoïque et 3-(R)-hydroxytétradécanoïque	<i>A. fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium commune</i> , <i>Penicillium anomala</i> ,	<b>Digaitiene et al., 2012</b>
	Peptidique, Acide phényl-lactique et hydroxy-phényllactique	<i>P. nalgiovense</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. fumigatus</i> ,	<b>Guo et al., 2011</b>
	Acide lactique	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i>	<b>Digaitiene et al., 2012</b>
	3,6-bis(2-méthylpropyl)-2,5-pipérazinedion	<i>A. flavus</i>	<b>Prema et al., 2008</b>
<i>Lb. reuteri</i>	Acetic acid, phényllactique, acide lactique Reutéline	<i>F. graminearum</i> , <i>A. niger</i>	<b>Mauch et al., 2010</b> <b>Chung et al., 1989</b>
<i>Lb. casei</i>	Peroxyde d'hydrogène Lactique et cyclo-(Leu-Pro).	<i>Penicillium</i> sp	<b>Gourama, 1997</b> <b>Atanassova et al., 2016</b>
<i>Lb. paracasei</i>	Diacetyl Diacetyl, acide, acétique, butanoïque, 2,3-pentadione	<i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium</i> sp. <i>P. solitum</i> , <i>Penicillium</i> sp.	<b>Crowley et al., 2013</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	acidocin B, entereocin P, reuterin 6	Pas de cibles définies	<b>Lee et al., 2013</b>

<i>Lactobacillus helveticus</i>	lysostaphin, enterolysin A, helveticin J	Pas de cibles définies	<b>Parada et al., 2007; Todorov, 2009; Mahrous et al., 2013; Perez et al., 2014</b>
<b>Genre <i>Enterococcus</i></b>			
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bactériocine	Pas de cibles définies	<b>Roy et al., 2009</b>
<i>Enterococcus faecium</i>	Lactococcin G, plantaricin A, enterocin X [29,30]	Pas de cibles définies	<b>Hu et al., 2010; Perez et al., 2014</b>
<b>Le genre <i>Leuconostoc</i></b>			
<i>Ln. citreum</i>	Acide lactique, Acide acétique, éthanol, peroxyde d'hydrogène, acide azélaïque, acide phényllactique, acide (S)-(-)-2-hydroxyiso-caproïque, acide DL- $\rho$ -hydroxyphenyl, acide, vanillique, Cytidine	<i>Penicillium corylophilum</i> , <i>Elymus repens</i>	<b>Le Lay et al., 2016</b>
<i>Leuconostoc gelidum</i>	pediocin PA1, sakicin A, leucocin A	Pas de cibles définies	<b>Sawa et al., 2005; Dimov et al., 2005; Todorov, 2009; Zacharof et Lovitt, 2012 ;</b>
<b>Genre <i>Pediococcus</i></b>			
<i>Pc. pentosaceus</i>	Peptide	<i>A. niger</i>	<b>Coloretti et al., 2007</b>
<b>Genre <i>Weissella</i></b>			
<i>W. paramesenteroides</i>	Acetic acid	<i>A. flavus</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>S. oryzae</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>S. minor</i>	<b>Yang et Chang, 2010</b>

### 1.7 La biopréservation

Le remplacement des conservateurs chimiques par des conservateurs "naturels" s'avère aujourd'hui primordial. Les bactéries lactiques ont été réalisées comme un groupe de bactéries bio-préservatif au début des années 1900 (**Narayanapillai et al., 2012**). L'utilisation de ces bactéries semble être une bonne alternative de biopréservation des produits laitiers potentiellement susceptibles aux contaminations fongiques. Le concept de la biopréservation est utilisé depuis des milliers d'années dans les aliments fermentés. La biopréservation, qui implique l'utilisation de cultures microbiennes sélectionnées pour leur capacité à contrôler la croissance des microorganismes d'altération qui augmente la qualité sanitaire et la durée de vie des aliments (**Ross et al., 2002**), a pris un développement considérable (**Mills, Stanton, Hill and Ross 2011**). Les bactéries lactiques (BL) étroitement associées aux aliments fermentés et dont la majorité possède le statut généralement reconnu comme sûr (GRAS) et appartient à la liste de présomption qualifiée de sécurité (QPS) en Europe, sont particulièrement bien adaptées aux produits laitiers préservation (**Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet and Guéguen, 2008**). Les BL sont connus pour posséder des activités antimicrobiennes liées à leur forte concurrence pour les nutriments, à la diminution du pH due à leur métabolisme fermentaire et à la production de métabolites inhibiteurs. Plusieurs espèces de Lactobacilles (*Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*...), les Pédicoques (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*) et les Lactocoques (*Lc. lactis*) ont été décrits comme antifongiques (**Schnürer and Magnusson 2005**).

L'intérêt des agents antimicrobiens produits naturellement, comme les bactériocines, est en augmentation, puisque les consommateurs de nos jours demandent des aliments « naturels et peu transformés » (**Herrerros et al., 2005**). Les bactériocines produites par les bactéries lactiques ont reçu une attention considérable au cours des dernières années pour leur possible bio-préservative dans les aliments, avec une réduction résultante de l'utilisation de conservateurs chimiques (**Narayanapillai et al., 2012**).

Plusieurs bactériocines de bactéries lactiques offrent des applications potentielles dans la conservation des aliments et l'utilisation des bactériocines dans l'industrie alimentaire peuvent aider à réduire l'ajout de conservateurs chimiques ainsi que l'intensité des traitements thermiques, qui peuvent produire des aliments qui ne sont plus naturellement préservés et riches en organoleptique et qui réduisent les propriétés nutritionnelles (**Mami et al., 2008**).

Les extraits de végétaux des plantes ont été utilisées depuis plusieurs années eux aussi, dans divers domaines à cause de leurs différentes propriétés médicinales et aromatique. De plus, ils

ont la capacité de produire naturellement des composés antibactériens et antifongiques (**Niger, 2012**), ces extraits sont les huiles essentielles.

## 2. Agent Pathogène

### 2.1 Généralité sur le genre *Alternaria*

En 1816, Nees décrit pour la première fois un champignon qu'il nomme *Alternaria tenuis*. Le genre *Alternaria alternata*, par la suite a été décrit par **Neergaard (1945)**, **Joly (1964)**, et **Simmons, (1993)**. Il est classé parmi les Deuteromycetes Dematiaceae (La famille des **Dematiaceae**, ou **Dematiacées** est une famille de champignons autrefois classée dans les deutéromycètes). La complexité taxonomique des *Alternaria* est liée à leur diversité et leur hétérogénéité a généré de nombreuses classifications.

L'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques, a abouti au classement du genre parmi les Ascomycètes au sein de la classe des Dothideomycètes. Ils sont phylogénétiquement proches de nombreuses espèces phytopathogènes (comme *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium*, *Pyrenophora*, *Clochliobolus*,... etc.) (**Calmes, 2011**).

Le genre *Alternaria* regroupe près de 275 espèces (**Simmons, 2007**) ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (**Simmons, 1993**), avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et post-récolte (**Logrieco et al., 2009; Lawrence et al., 2013; Ainur Turzhanova et al., 2020; Mario Masiello et al., 2020**). Si certaines espèces vivent à l'état saprophyte pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes, d'autres sont responsables de maladies atteignant les plantes et les insectes. Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement. Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les jeunes pousses atteintes constituent une source importante d'inoculum primaire pour les plantes matures où tous les organes aériens peuvent être affectés (**Champion, 1997**). La gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives. C'est le cas, par exemple d'*A. triticina* sur les céréales (**Calmes, 2011**).

Le stockage des graines contaminées peut favoriser l'accumulation des toxines surtout étudiées pour l'espèce *A. alternata*. Les *Alternaria* sont donc des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sol, textiles, graines (**Linan et al., 1999**). L'aie joue un rôle important dans la dispersion des spores. Les spores d'*Alternaria* sont des allergènes, et également infectieuses déterminants le plus souvent des formes cliniques cutanéopidermique favorisées par certains facteurs: diabète mal équilibré, corticothérapie (**baddilet, 1991**).

D'un point de vue taxonomique, le genre *Alternaria* est classé dans la division des Ascomycota, l'ordre des Pléosporales (champignons ayant des conidiophores peu différenciés, libres, à croissance sympodiale et des conidies qui ne se forment pas dans un réceptacle spécial) et la famille des *Pleosporaceae*. Les champignons du genre *Alternaria* ont historiquement été classés parmi les Deutéromycètes (Deuteromycota, Fungi Imperfectii), un phylum regroupant les champignons à mycélium cloisonné dont on ne connaît pas la forme de reproduction sexuée, s'ils en ont une. Pour certaines espèces d'*Alternaria*, des formes parfaites (sexuées) ont été décrites, et classées dans des genres proches entre eux (*Clathrospora*, *Leptosphaeria*, *Lewia*, *Pleospora*) (**Lecomte, 2013**)

## 2.2 Historique de la taxonomie d'*Alternaria*

Le genre a été décrit pour la première fois par **Nees (1816-1817)** avec *A. tenuis* comme type. Elle se caractérise par la production de grandes conidies brunes ou foncées avec des cloisons longitudinales et transversales (phaeodictyospores), portées par des conidiophores peu visibles, et avec un rétrécissement conique distinct ou « bec » à l'extrémité apicale. Ces structures peuvent être solitaires ou produites selon divers modèles de chaînes. Plusieurs descriptions subséquentes d'espèces *Alternaria* supplémentaires ont été faites par **Elliot (1917)**, **Wiltshire (1933)**, **Neergaard (1945)**, **Joly (1964)**, **Simmons (1967)** et **Ellis (1971, 1976)**. Les méthodes traditionnelles d'identification des espèces d'*Alternaria* sont principalement basées sur les caractéristiques morphologiques des structures reproductrices, y compris la forme, la couleur, la taille, le cloisonnement et l'ornementation. Cependant, en raison de la grande diversité des espèces et de la complexité de ces structures, l'identification basée uniquement sur ces caractéristiques peut être extrêmement laborieuse et chronophage, devenant réservée aux experts dans ce domaine. Plusieurs tentatives d'organiser le genre en groupes sous-génériques pour simplifier sa classification ont été proposées, formellement ou informellement (**Pryor et Gilbertson, 2000**). Une ségrégation courante consiste en la distinction de deux groupes selon la taille des conidies, les *Alternaria* « grandes spores » (taille des conidies 60–100  $\mu$ ) et « petites

spores » (conidies  $<60 \mu$ ). Les espèces à petites spores sont les saprotrophes cosmopolites, les phytopathogènes, les allergènes et les producteurs de mycotoxines, étant le groupe le plus fréquemment signalé dans les aliments. Sa taxonomie est encore en cours de révision et il est nécessaire de les identifier avec précision dans un large éventail de disciplines. Plus récemment, **Simmons (1992)** a développé une classification basée sur le concept de groupe d'espèces, organisant le genre en un certain nombre de groupes d'espèces distingués par des modèles de sporulation et la morphologie des conidies, dont chacun est typifié par une espèce représentative, par exemple le *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria*, *A. porri* ou *A. brassicicola* groupe d'espèces. Cette classification au niveau sous-générique organise l'assemblage morphologiquement diversifié d'*Alternaria* spp. et permet une discussion généralisée d'espèces morphologiquement similaires (**Virginia, 2017**).

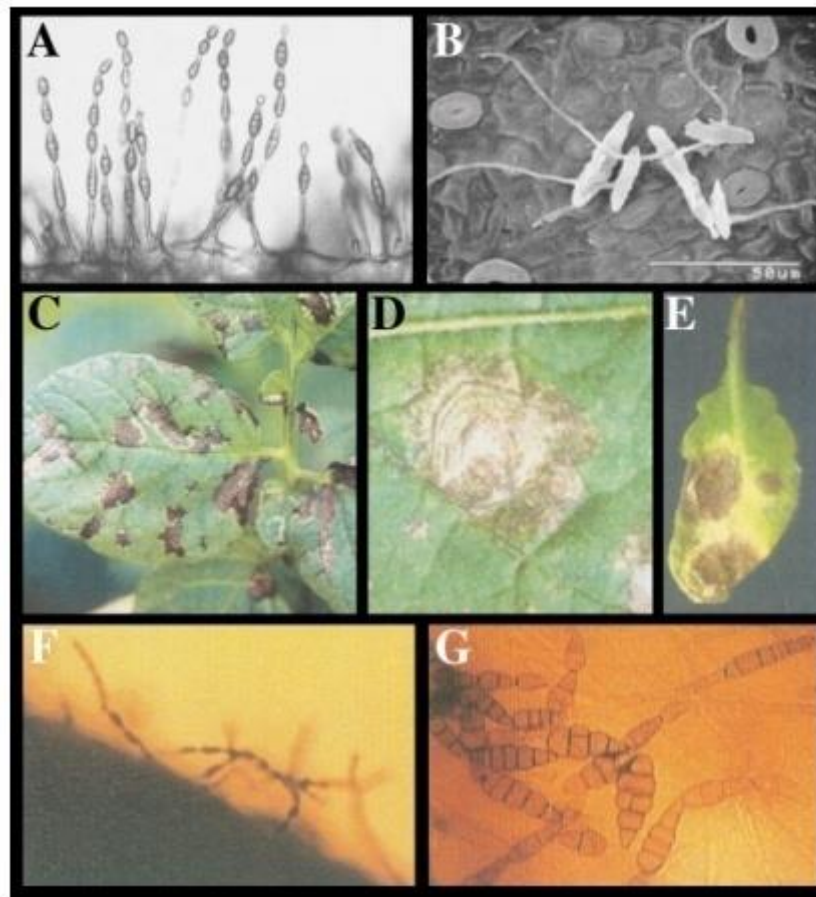
Avec l'avancement des techniques moléculaires, plusieurs études ont examiné les relations taxonomiques entre *Alternaria* spp. en utilisant une variété de méthodes pour tenter d'établir un consensus avec les espèces morphologiques contemporaines. La plupart d'entre eux se sont concentrés sur l'*Alternaria caténulaire* à petites spores, qui montrent peu de résolution dans leur phylogénie moléculaire. Cependant, les analyses cladistiques des «gènes domestiques» couramment utilisés pour d'autres genres, tels que l'ADN ribosomal de la grande sous-unité mitochondriale (mtLSU), l'espaceur interne transcrit (ITS), la  $\beta$ -tubuline, le facteur d'élongation de la traduction  $\alpha$ , la calmoduline, l'actine et la chitine synthétase, n'apas réussi à faire la distinction entre les espèces à petites spores, à l'exception du groupe d'espèces *A. infectoria* (**Armitage et al., 2015; Virginia, 2017; Armitage et al., 2020**).

En plus de l'analyse morphologique et moléculaire, la production des métabolites secondaires a été utilisée comme moyen de classification et d'identification, profitant de l'énorme potentiel de ce genre pour biosynthétiser les métabolites secondaires (**Virginia, 2017**).

### 2.3 Classification du genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* a été établi en 1817 avec *A. alternata* (à l'origine *A. tenuis*) comme isolat type. En raison de l'absence de stade sexuel identifié pour la grande majorité des espèces d'*Alternaria*, ce genre a été classé dans la division des champignons mitosporiques ou le phylum Fungi Imperfecti. La principale caractéristique taxonomique du genre *Alternaria* est la production de grandes conidies multicellulaires de couleur foncée (mélanisées) avec des cloisons longitudinales et transversales (phaeodictyospores). Ces conidies sont les plus larges près de la base et se rétrécissent progressivement en un bec allongé, donnant une apparence de club (**figure 05**). Ils sont produits en chaînes simples ou ramifiées sur des conidiophores courts

et dressés. *Alternaria* forme des conidies qui se présentent sous forme de saillies du protoplasme à travers les pores de la paroi cellulaire des conidiophores. Au début du développement conidien, l'apex du conidiophore s'épaissit et une structure en forme d'anneau transparente aux électrons se dépose au niveau du dôme apical. Au niveau de la cavité centrale de cette structure transparente aux électrons, un pore est formé par la dissolution de la paroi cellulaire. À travers ce pore, le cytoplasme uniquement couvert par la membrane plasmique est expulsé. La pression de turgescence nécessaire pour pousser le cytoplasme à travers le pore est vraisemblablement fournie par la grande vacuole bien développée qui apparaît à ce stade dans la cellule conidiophore. Par la suite, un noyau migre dans la nouvelle conidie, puis se dépose sur une paroi cellulaire (**Honda et al., 1987, 1990**). La mélanine présente dans les conidies est concentrée dans la région externe des parois cellulaires primaires, qui sont dérivées de la paroi d'origine de la spore en développement, et dans les septa, qui délimitent les spores individuelles de la conidie multicellulaire. Une fois les cellules délimitées par des septa, des parois cellulaires secondaires se déposent, mais celles-ci restent non mélanisées, ce qui suggère une régulation développementale du dépôt de mélanine pendant la conidiogenèse (**Campbell, 1969; Carzaniga et al., 2002; Kawamura et al., 1997**). La mélanine est probablement activement impliquée dans le développement des conidies, car la perturbation d'un gène de biosynthèse de la mélanine chez *A. alternata* a réduit la taille des conidies ainsi que le nombre septal (**Kawamura et al., 1999**).



**Figure 05:** Symptômes causés par *Alternaria* spp. (A) Stand d'*A. Alternata* conidiophores avec des chaînes de conidies. (B) Les conidies en germination d'*A. Alternata* f.sp. *citri*, l'agent causal de la tache brune, infectant une feuille d'agrume. (C) Tache noire sur la pomme de terre causée par *A. solani*. (D) Symptôme typique de « point cible» d'*Alternaria*: une série des anneaux concentriques sur le site d'attaque. (E) *A.brassicicola* sur une feuille sensible d'*Arabidopsis*. (F) développer des chaînes de conidies *A. brassicicola* à la surface d'une feuille d'*Arabidopsis* inoculée. (G) Conidies d'*A. Brassicicola* avec septa longitudinaux et transversaux (phaeodictyosporés). (Thomma, 2003).

#### 2.4 *Alternaria alternata*

*Alternaria* sect. *Alternaria* contient la plupart des espèces d'*Alternaria* à petites spores avec des conidies concaténées. Près de 60 espèces morphologiques ou spécifiques à l'hôte peuvent y être attribuées section, y compris les espèces types du genre *Alternaria*, *A. alternata*. *Alternaria alternata* est connue comme la cause de la tache foliaire et d'autres maladies chez plus de 100 espèces hôtes de plantes, mais aussi comme une maladie post-récolte dans diverses cultures (Woudenberg, 2015). *Alternaria alternata* est un champignon filamenteux cosmopolite ubiquiste. Communément isolé à partir des plantes, des sols, de nourriture pourrie ainsi que de l'air ambiant des habitations (Criquet *et al.*, 2008).

## 2.5 La plante hôte

### 2.5.1 La Tomate

La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est une plante annuelle de la famille des Solanaceae. Originaire du Sud-Ouest de l'Amérique (Hermann *et al.*, 2018), introduite en Europe, Italie, Espagne au XVI siècle comme plante ornementale. Elle est cultivée depuis le XVIII siècle pour son fruit, consommé comme légume. La plante étant de la même famille que la belladone, ses fruits n'étaient pas considérés comme comestible, mais utiles en médecine (Jean-Claude *et al.*, 2003), elle est aujourd'hui cultivée dans le monde entier pour ses fruits qui jouent un rôle important dans l'alimentation humaine. L'importance nutritionnelle du fruit de tomate tient à sa richesse en éléments nutritifs tels que les acides aminés essentiels, la vitamine C, le lycopène et la  $\beta$ -carotène (Hermann *et al.*, 2018). Longtemps appelée (pommodoro), son nom de tomate n'a été accepté par l'Académie française qu'en 1835. Le nom signifie littérairement, pêche de loup, et fait référence au caractère toxique attribué initialement à ce fruit.

A l'heure actuelle, environ 160 millions de tonnes de tomates fraîches sont produites à partir de 4,7 millions d'hectares (Singh *et al.*, 2016).

Pendant longtemps, les tomates étaient connues sous le nom de *Lycopersicon esculentum*, mais des travaux récents ont montré qu'elles faisaient partie du genre *Solanum* - comme Linnaeus l'a reconnu lors de sa première description de l'espèce. La tomate est une plante herbacée annuelle, appartenant au groupe des légumes-fruits (Aissa, 1999) (figure 06), est caractérisée par: La tomate est consommée sous diverses formes, y compris crue, comme ingrédient dans plusieurs plats, sauces, salades et boissons. Bien qu'il soit botaniquement un fruit à baies, il est considéré comme végétal à des fins culinaires. Le fruit est riche en lycopène, qui a des effets bénéfiques sur la santé. Les plantes atteignent généralement 1 à 3 mètres de hauteur et ont une tige faible qui s'étend souvent sur le sol. C'est une plante vivace son habitat naturel, bien que souvent cultivé à l'extérieur dans les climats tempérés comme une annuelle. La plupart des cultivars produisent des fruits rouges, mais un certain nombre de génotypes avec des fruits jaune, orange, roses, violets, verts, noirs ou blancs sont également disponibles. Les fruits multicolores et rayés sont également assez frappants (Singh *et al.*, 2016). Les tomates cultivées pour le balayage et les sauces sont connues sous le nom de tomates italiennes, qui ont généralement une teneur en eau plus faible avec les fruits allongés (Singh *et al.*, 2016).



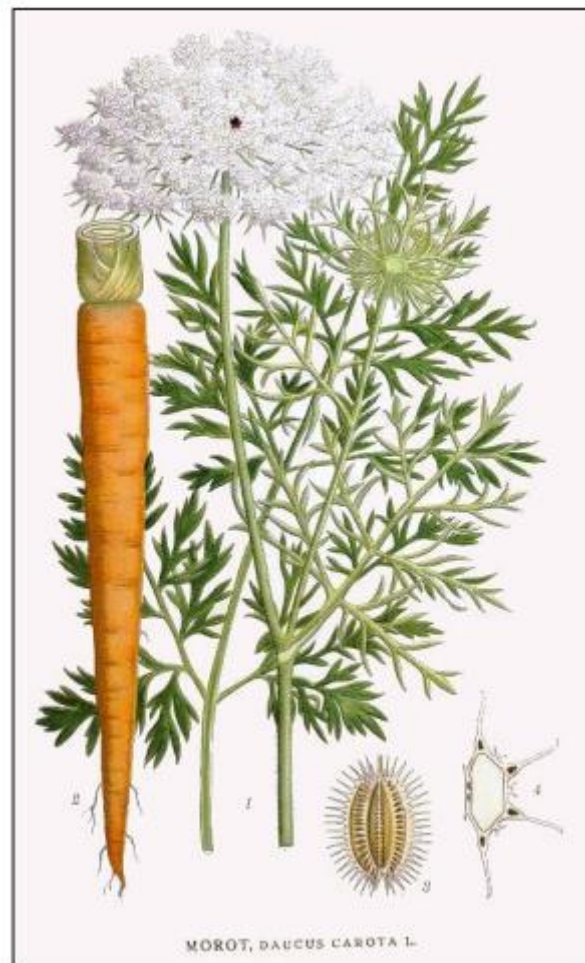
**Figure 06:** Branche de tomate: (a) tige, (b) stipule, (c) feuille composée, (d) fleurs, (e) tomate (baie). (Milet, 2017)

### 2.5.2 La Carotte

La carotte (*Daucus carota*) est une plante de taille moyenne (0,6 à 2 m au moment de la floraison). Nous la connaissons pour sa racine pivotante développée en organe de réserve (**figure 07**), charnue, cassante, pigmentée (rarement blanche), agréable au goût et non ramifiée (en sol meuble, sans obstacle) (**Reduron, 2007**). Les feuilles sont minces, souvent mates, avec un pourtour triangulaire (**figure 07**). Elles sont très divisées-pennées, à divisions écartées très allongées, étroites, linéaires ou lancéolées-linéaires (**Reduron, 2007**). Les inflorescences sont constituées de grandes ombelles composées de fleurs blanches jaunâtres, allogames et protandres, regroupées en ombellules. Chaque fleur est constituée de cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines et deux carpelles (**Tirilly et Bourgeois, 1999**). La présence d'une fleur pourpre centrale est très variable chez la sous-espèce *sativus* (**figure07**). Lors de la maturation des fruits, les rayons de l'ombelle se referment en urne (**Reduron, 2007**). Le fruit (communément appelé graine de façon abusive) est un diakène albuminé de forme elliptique (**figure07**) (**Tirilly et Bourgeois, 1999**). La carotte est une plante diploïde et possède  $2n = 18$  chromosomes, aucune modification de ploïdie ne semble avoir joué un rôle dans la différenciation de la forme cultivée (**Chaux et Foury, 1994**). Son génome a une taille de 473 Mbp (génome haploïde; **Arumuganathan et Earle, 1991**), ce qui est quatre fois celui d'*Arabidopsis thaliana*, égal à celui du riz (*Oryza sativa*) et la moitié de celui de la tomate (*Solanum lycopersicum*). La taille de sa carte génétique est estimée à 900 cm (**Vivek et Simon, 1999**). Jusqu'à très récemment, peu de données moléculaires étaient disponibles concernant la carotte (**Cavagnaro et al., 2008**).

Des séquences issues d'un projet de transcriptome ont seulement été publiées depuis peu (Iorizzo *et al.*, 2011). Le séquençage de son génome est en cours dans le cadre d'un projet confidentiel établi au niveau mondial entre plusieurs firmes semencières et quatre laboratoires de recherche publique, dont l'équipe 'QuaRVeg' de l'IRHS.

La carotte est utilisée pour l'alimentation, c'est son utilisation la plus connue (consommation de sa racine).



**Figure 07:** Plant de carotte adulte. Reproduction d'une peinture du botaniste suédois **Carl Axel Magnus Lindman (1856-1928)**, extraite de son livre 'Bilder ur Nordens Flora' (1901-1905) (Lecomte, 2013).

### 2.6 Alternariose (brulure précoce)

L'alternariose est une maladie très répandue chez la tomate de plein champ et parfois chez la tomate de serre élevée dans du sol et en substrats artificiels. *Alternaria solani* infecte aussi la pomme de terre, l'aubergine et des adventices de la famille des solanacées. En nature,

L'*Alternaria alternata* se trouve fréquemment sur la matière organique et on estime généralement que c'est un parasite faible et opportuniste. L'alternariose est une maladie importante et largement distribuée dans le monde entier causant des pertes économiques de rendement. Cette maladie est provoquée par *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (Agrios, 1997; Abbo *et al.*, 2014; AbdAlla *et al.*, 2014). Le terme précoce dans la brûlure précoce a été utilisé pour distinguer la brûlure tardive causée par *Phytophthora infestans* (Sherf et MacNab, 1986). La brûlure précoce est une maladie bien connue chez la tomate et la pomme de terre, elle est apparue plutôt que la brûlure tardive aux Etats-Unis d'où le nom de la brûlure précoce. Toutefois, le nom induit en erreur, car la maladie attaque rarement les jeunes plantes en croissance et affecte souvent les plantes mures et âgées montrant une perte de vigueur. La brûlure précoce peut affecter le feuillage, les tiges et dans des cas plus sévères, les fruits. C'est une maladie fongique qui affecte les cultures des Solanacées dans le monde entier (Batista *et al.*, 2006; Milet, 2017).

### 2.7 Dégâts de la maladie

Les espèces d'*Alternaria* ont été signalées à causer des maladies dans près de 400 espèces de plantes; *A. alternata* seul peut infecter plus de 100 espèces de plantes (Simmons, 1992; Rotem, 1994). Ce phytopathogène peut entraîner une défoliation complète et des pertes de récolte dans de courtes périodes de temps (Chaerani *et al.*, 2006). Au Canada, Inde, Etats-Unis et au Nigeria, on a annoncé des pertes de rendement en hausse de 79% en raison des dégâts de la brûlure précoce (Basu, 1974; Datar et Mayee, 1981; Sherf et MacNab, 1986; Gwary et Nahunnaro, 1998). Dans le cas d'épidémies sévères, l'alternariose peut causer une défoliation prématurée, qui affaiblit les plantes et expose le fruit à une blessure d'insolation (Sherf et MacNab, 1986). Une fois le fruit infecté est tombé au sol, des pertes de 30-50% de la récolte ont lieu (Jones *et al.*, 1997). La brûlure précoce réduit les régions photosynthétiques, et qui dans des cas servers peut défolier les plantes. Cette maladie débute sur les feuilles de la base et suivant les conditions de l'été, progresse rapidement vers le sommet (Bovey, 1972). Le rendement est réduit lorsque les plantes ne parviennent pas à fructifier.

Quand la maladie progresse, ces taches grandissent et peuvent même gagner l'ensemble de la feuille. Les taches sont de couleur vert-olive à brun foncé-noir. Au fur et à mesure que la maladie progresse (c-à-d en conditions favorables à son développement) en culture, les attaques sur tubercules sont très peu courantes. Elles résultent d'atteintes ayant eu lieu lors de la récolte ou de la mise en conservation, lorsque des spores d'*Alternaria* entrent en contact avec la chair

des tubercules mal indurés et/ou blessés. Les symptômes sont des taches (jusqu'à quelques cm) en dépression, de couleur brun-violet ou noir métallisé (**Daniel, 2006**).

## 2.8 Symptômologie

Les symptômes d'alternariose appeler aussi fonte de semis, se manifestent par une altération noire plus ou moins étendues sur tige à proximité du collet ou plus en hauteur. Après avoir ceinturé la tige, les lésions peuvent entraîner assez rapidement le dessèchement des plants et leur mort.

L'attaque commence par les vieilles feuilles basses (**Messiaen et al., 1991**). Les premiers symptômes de la maladie sur le terrain sont précoces et se traduisent par l'apparition des taches foliaires d'un diamètre de 1 mm sur les tiges et les feuilles, qui sont d'abord vert foncé, puis virent rapidement brunes à noires (**figure 08 A, B, C**). Elles sont plus ou moins arrondies, parfois angulaires lorsqu'elles sont délimitées par les nervures. Par la suite, elles s'étendent progressivement et montrent de discrets motifs concentriques leur conférant l'aspect d'une cible (**figure 08 A, B, C**). Un halo jaune plus ou moins vif les ceinture. Atteignant plusieurs millimètres, révèlent généralement de discret anneaux concentriques d'un brun plus foncé (**Blancard et al., 2012**). Elles finissent par se nécroser.

Lésions assez comparables sur tiges, les pétioles et pédoncules qui peuvent atteindre jusqu'à 5 cm de longueur (**Grogan et al., 1975; Vloutoglou et Kalogerakis, 2000; Verma et Verma, 2010**). Ces lésions ou chancres progressent lentement sur la tige, une fois celle-ci est ceinturées la plante meurt. Des petites lésions brunes apparaissent ensuite entre les plus grandes lésions. Elles ont une teinte noirâtre et sont souvent plus allongée (**figure 08D**).

L'altération concaves sur fruits, bien délimitées, apparaissent à proximité de la cicatrice pédonculaire et des sépales. Une fois les fruits verts ou murs sont envahies, les tissus colonisés prennent progressivement une couleur noirâtre occasionnant de larges lésions circulaires concaves, parfois plissés en surface à la texture plutôt dure. Un dense feutrage les recouvre à terme correspondant à la sporulation d'*Alternaria* (**Blancard et al., 2012**). La surface des zones altérées des fruits se plisse et montre parfois des motifs concentriques (**figure 08 E**) (**Blancard, 2020**).



**Figure 08:** Symptôme de l'alternariose : des taches foliaires de tomate sur la feuille (A, B, C), la tige (D), et le fruit (E) provoquées par *Alternaria*

## 2.9 Cycle vital

Les *Alternaria* se reproduisent de manière asexuée; un stade sexuel de ce champignon est inconnu. Le champignon survit principalement dans les résidus de culture infectée et le sol, mais également à la surface des semences, les volontaires de plants de tomates et d'autres plantes de la famille des solanacées (pomme de terre, aubergine, ...) sous la forme de conidies et de mycélium. Au printemps, les conidies sont produites sur les résidus de culture, c'est l'infection primaire (**figure 09**). La paroi cellulaire épaisse des conidies permet au champignon de s'adapter aux conditions climatiques défavorables (**Pragya, 2017**). La sporulation et la dispersion des spores sont favorisées par l'alternance de conditions sèche et humide (**Pragya, 2017**). Les conidies sont dispersées par le vent et l'eau (éclaboussures, irrigation par aspersion) sur les feuilles basales ou colonisent les feuilles qui sont en contact avec le sol. Les spores contaminent les plantes d'un même champ ou d'un champ à l'autre, car elles peuvent être dispersées sur de longues distances.

Les conidies germent à une température de 8 à 32°C dans des conditions fraîches et humides en présence d'humidité pour former des tubes germinatifs. Les tubes germinatifs pénètrent directement dans les tissus de l'hôte ou pénètrent par les stomates ou les blessures, provoquant ainsi une infection (**Pragya, 2017**). Le développement du champignon exige une température se situant entre 15 et 30 °C et une humidité importante sous la forme de rosées, de faibles pluies fréquentes (5 mm), d'irrigation par aspersion ou d'une humidité relative élevée (> 90 %). Les lésions apparaissent après 2 à 3 jours d'infection en fonction des conditions environnementales, de l'âge des feuilles et de la sensibilité du cultivar, et les spores sont produites 3 à 5 jours après l'apparition des lésions (**Pragya, 2017**). En général, une longue période d'humidité est nécessaire pour la production de spores, mais les spores sont également produites dans des conditions alternées humides et sèches. Premièrement, les conidiophores se développent pendant les nuits humides, qui produisent ensuite des spores ou des conidies dans une autre nuit humide après la période de lumière et de sécheresse du jour. Dans l'étape suivante, les conidies sont rapidement dispersées par le vent et les éclaboussures de pluie et poursuivent le cycle de la maladie dans d'autres parties saines de la même plante ou de différentes plantes.

La brûlure d'alternariose, est une maladie avec plusieurs cycles de nouvelles infections secondaires par saison.

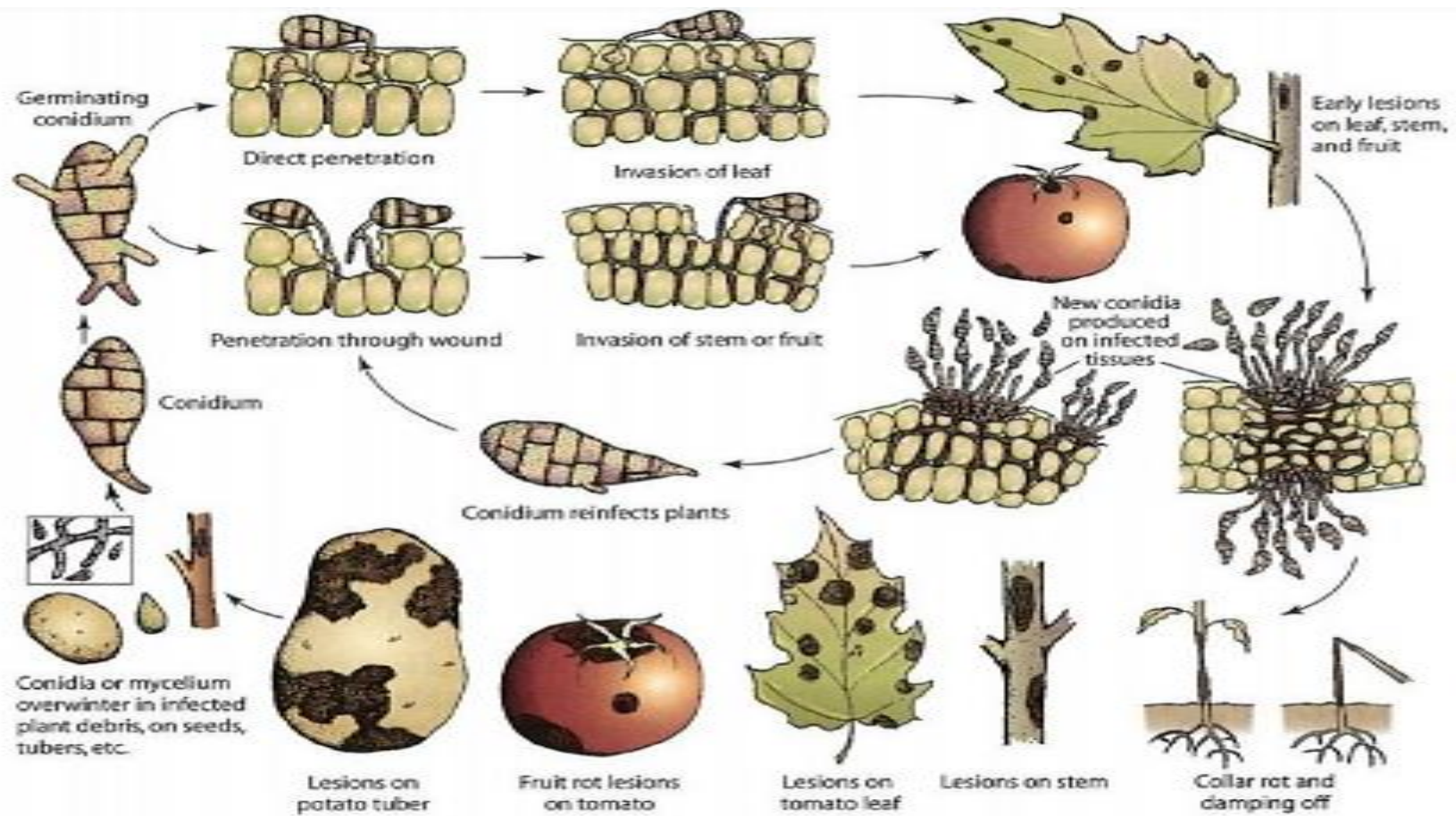


Figure 09: Développement et symptômes de maladies causées par *Alternaria* spp. (Agris, 2005).

### 2.9.1 La conservation, source d'inoculum

L'*Alternaria* peut se conserver dans les résidus de culture, les sols contaminés et les tubercules infectés durant plusieurs années (**Christine Jean, 2000**). En raison de son mycélium mélanisé, peut se fixer à la surface des graines de tomate, de carotte, dans le sol et sur les débris végétaux, durant plusieurs années. Ses conidies et à ses chlamydospores (**Blancard, 2020**) peuvent servir de structure de survie (**Basu, 1974; Pattersson, 1991**). Elle serait aussi capable de se maintenir d'une saison à l'autre sur d'autres solanacées comme la tomate, l'aubergine, poivron (**Neegaard, 1945; Ellis et Gibson, 1975; Blancard et al; 2012; Blancard, 2020**).

### 2.9.2 Pénétration et invasion

Une fois les spores d'*Alternaria* sont en contact avec les cellules végétales, elles sont capables de germer et produisent un ou plusieurs tubes germinatifs, la pénétration dans les tissus végétaux se fait soit directement à travers les stomates ou les blessures (**Sherf et Macneb, 1986; Agrios, 2005; Blancard, 2020**), ou soit par pénétration enzymatique, cette stratégie est la plus évidente chez les *Alternaria*. La colonisation de l'hôte est facilitée par des enzymes (cellulase, pectine galacturonase de méthyle). Le champignon envahit rapidement les tissus foliaires, les lésions deviennent visibles 2 à 3 jours après l'infection, la production de spores se produit 3 à 5 jours plus tard (**Blancard et al., 2012**).

### 2.9.3 Sporulation et dissémination

Sur les tissus colonisés se forme de courts conidiophores surmontés de longues conidies pluricellulaires (**Blancard, 2020**). Les spores sont disséminées par le vent, la pluie, les insectes et les irrigations par aspersion ; les conidies produites assurent des contaminations secondaires et par la suite plusieurs cycles parasitaires peuvent avoir lieu dans la culture (**Sherf et MacNeb, 1986; Andersen et Frisvad, 2004; Leiminger et al., 2010; Blancard et al., 2012**). Les semences, les travailleurs, notamment *via* leurs outils, y contribuent également.

### 2.10 Méthodes d'identification des champignons

L'identification au niveau des espèces est très difficile dans ce genre car la plupart des espèces d'*Alternaria* présentent une plasticité morphologique considérable qui dépend des conditions de culture, du substrat, de la température, de la lumière et de l'humidité (**Garganese, 2016**). De plus, plusieurs isolats ont des traits d'espèces intermédiaires qui ne se séparent pas clairement en espèces reconnues (**Mario Masiello, 2020**). L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les végétaux est une étape très importante. En effet, toutes les espèces n'ayant pas les mêmes caractères physiologiques ni les mêmes exigences, l'identification peut donner des indications précieuses sur l'origine d'une contamination et

permettre un traitement adapté. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. (**Abdel Massih, 2007**). Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (**Tabuc, 2007**).

### **2.10.1 Identification morphologique**

Selon **Botion et Coll (1985)**, l'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Ces méthodes d'identification peuvent être complétées par une analyse moléculaire (**Lecellier, 2013**).

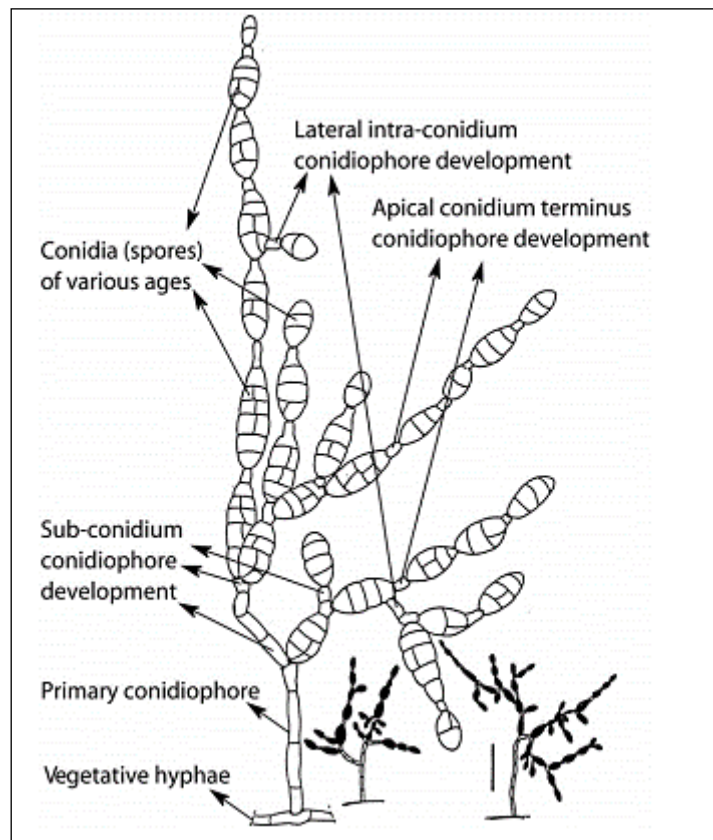
**2.10.1.1 Caractères cultureux :** Vitesse de la croissance apicale ; texture, marge, épaisseur et couleur de la colonie; pigmentation de l'agar, production d'exsudat et odeur des colonies.

#### **2.10.1.2 Caractères morphologiques**

**a- Aspect macroscopique:** Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons filamenteux, plusieurs aspects de l'appareil végétatif sont observés : - l'aspect : duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre. - le relief : plat, plissé ou cérébriforme. - la taille : petite, étendue ou envahissante. - la couleur: blanche, crème ou colorée (Verte, Brune, Orangée, Violette, Grises,...). La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres telle la vitesse de la pousse des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure (**Lecellier, 2013**).

**b- Aspect microscopique:** Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures des champignons filamenteux sont observées comme l'appareil végétatif, les organes de fructification et les spores : - le thalle végétatif : septé (diamètre étroit et régulier de 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) ou siphonné (filaments peu ou pas ramifiés, diamètre large et irrégulier de 5 à 15  $\mu\text{m}$ ), paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline). les organes de fructifications (**figure 10**) : présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation des conidies (issues directement du thalle, solitaires (aleuriospores) ou en chaînes (arthrospores), ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masse, en têtes ou en chaînes basipètes ou acropètes), modes d'implantation des cellules conidiogènes [indifférenciée ou peu indifférenciée, différenciées (sur le filament végétatif, porté sur les conidiophores dispersés ou groupés)]. - les spores: endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies),

l'aspect des spores [amérospores (unicellulaires et de petite taille), didymospores (bicellulaires) phragmospores (pluricellulaires à cloisons transversales), dictyospores (pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales), scolécospores (étroites et effilées)], présence ou non de chlamydo-spores (**Lecellier, 2013**).



**Figure 10:** *Alternaria alternata*: portions de spore en amas. La figure identifie les différents développements de spores et de conidiophores. EGS 34-016. Barres de 50 µm. Copyright des dessins au trait par E.G. Simmons, 1999. Mycotaxon 70: 336. (**Taralova et al., 2011**).

Des clés d'identification des champignons sont établies par différents groupes de chercheurs afin de classer les nouvelles souches (**Cordova Lopez, 1998**).

### 2.10.2 Identification génétique

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) qui ne nécessitent plus obligatoirement un examen morphologique (**Hinrikson et al., 2005; Feuilhade de Chauvin, 2005; Jin et al., 2004**). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (**Hinrikson et al., 2005**). L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en

mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de mortalité, particulièrement chez les immunodéficients (**De Aguire et al., 2004**). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (**Boysen et al., 2000; Hageskal et al., 2006**), par contre pour les *Fusarium*, les méthodes moléculaires existantes donnent des résultats fréquemment peu concluants et l'examen morphologique classique semble encore une méthode indispensable à l'identification des espèces appartenant à ce genre fongique (**Healy et al., 2005**). Si à l'heure actuelle les outils de l'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique dans les aliments. (**Tabuc, 2007**).

## 2.11 Les *Alternaria* producteurs de métabolite secondaire

### 2.11.1 Les mycotoxines

Les champignons du genre *Alternaria* appartiennent à des bactéries nécrotiques. Ils tuent les cellules végétales, notamment par l'action de toxines (**Agrios, 2005**). Leur virulence tient en compte de la nature des deux organismes, hôte-parasite, et impliquent à la fois les deux concepts, capacité parasitaire et réceptivité (**Joly, 1964**). *Alternaria* spp. peut produire une grande variété de métabolites toxiques qui jouent un rôle important dans la pathogénèse des plantes. Plusieurs de ces métabolites, dans des conditions environnementales déterminées, pourraient s'accumuler dans les aliments type végétales et être nocifs pour les humains et les animaux, autres membres du genre, tels que *A. citri*, *A. solani*, *A. longipes* et *A. tenuissima* et *A. arborescens* espèces infectoria groupes, sont également capables de produire toxines dans leurs hôtes (**Barkai-Golan, 2008**). Ces champignons sont considérés comme des polluants biologiques, en produisant des allergènes et des antigènes dans l'organisme, capables de déclencher une réponse immunitaire circulante de type immunoglobuline (E ou IgE), qui se manifeste par des réactions allergiques avec libération de médiateurs, tel que l'histamine chez le sujet sensibilisé (**Botta et Viala 2005**). Plusieurs travaux sur les toxines d'*Alternaria* ont été publiées au cours des dernières décennies (**Visconti et Sibilis, 1994; Panigrahi, 1997; Bottalico et Logrieco, 1998; Scott, 2001, 2004**). Ces composés appartiennent principalement à trois groupes structuraux différents: (i) les dérivés de la dibenzopyrone, l'alternariol (AOH), l'alternariol monométhyléther (AME) et l'altenuène (ALT); (ii) les altertoxines des dérivés du pérylène (ATX-I, ATX-II et ATX II); et (iii) le dérivé d'acide tétramique, l'acide ténazonique

(TA). Un autre métabolite de structure diverse, la tentoxine (TEN), a récemment été considéré comme une mycotoxine pertinente par les autorités internationales de sécurité alimentaire, bien que les données toxicologiques disponibles soient limitées et que seuls ses effets phytotoxiques aient été confirmés jusqu'à présent. TA, AOH, AME et ATX-I sont les principales mycotoxines d'*Alternaria* qui peuvent contaminer les aliments. C'est donc une espèce présentant un intérêt particulier pour les mycotoxicologues (**Visconti et al., 1988; Logrieco et al., 1990; Andersen et Thrane, 1996; Ostry, 2008**). *A. alternata* f. sp. *lycopersici* produit les toxines AAL. Ces toxines AAL sont structurellement liées aux fumonisines. Il n'y a qu'un seul rapport indiquant qu'ils se produisent naturellement dans l'ensilage de foin (**Yu et al., 1999**).

### 2.11.2 Présence de mycotoxines d'*Alternaria*, et *Alternaria* dans les aliments

Les espèces *Alternaria* sont généralement associées à des maladies des plantes causant la détérioration des produits agricoles avec pertes économiques. De plus, à la suite de la croissance d'*Alternaria*, plusieurs mycotoxines ont été détectées comme contaminants naturels dans ces produits. Les mycotoxines produites par les champignons d'altération entraînent une perte économique et des risques pour la santé humaine, et sont la principale préoccupation de l'industrie alimentaire (**Gray and Bemiller, 2003**). **Pitt et Hocking (1999)** ont estimé qu'environ 5 à 10% de la nourriture produite est détruite par la croissance des levures et des champignons dans les aliments. L'historique des conditions de l'aliment peuvent être un facteur majeur dans la détermination de toute détérioration fongique. L'accumulation de mycotoxines dans les fruits et légumes peut se produire au champ et pendant la récolte, après la récolte et l'entreposage. Les aliments végétaux infectés par la pourriture *Alternaria* ne sont évidemment pas adaptés à la consommation. Étant donné que les consommateurs rejettent les fruits visiblement moisissus ou pourris, on ne pense pas que les fruits frais entiers contribuent de manière significative avec les toxines d'*Alternaria* à l'exposition humaine. Cependant, les produits végétaux transformés peuvent introduire de grandes quantités de ces toxines dans l'alimentation humaine si les fruits pourris ou moisissus ne sont pas éliminés avant la transformation (**Andrea Patriarca and Virginia Fernandez Pinto, 2018**).

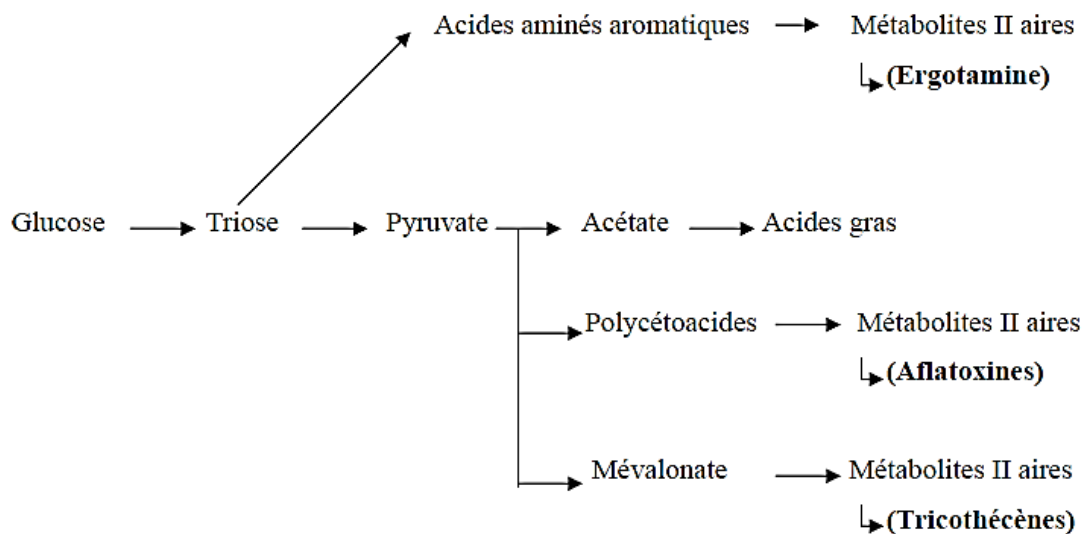
De plus, les champignons peuvent être responsables de saveurs indiscernables, de la production de mycotoxines et de composés allergènes. Il existe plus de 400 mycotoxines connues produites par différents champignons (**Filtenborg et al., 1996**). Les champignons producteurs de toxines tels que *Alternaria* constituent une menace sérieuse pour la santé humaine. Les six classes de mycotoxines couramment rencontrées dans différents systèmes alimentaires sont: les

aflatoxines, les fumonisines, les ochratoxines, la patuline, les trichothécènes et la zéaralénone (Dalié *et al.*, 2009).

Plusieurs cultures à valeur agricole sont sensibles à l'infection par différentes espèces d'*Alternaria* et peuvent contribuer à l'entrée de Mycotoxines d'*Alternaria* dans la chaîne alimentaire (Andrea Patriarca and Virginia Fernandez Pinto, 2018).

### 2.11.3 Les mycotoxines et les bactéries lactiques

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés pendant la phase stationnaire après la phase de reproduction et de croissance. Selon leur origine biologique, ils sont divisés en acide polyacétylique, terpènes et métabolites. Selon Steyn (1998), les aflatoxines sont formées par l'acide polyacétylique dans un processus complexe, tandis que l'ergotamine est formée par des peptides et des acides aminés. L'ochratoxine A est biosynthétisé par la phénylalanine et le dihydroisocoumarine. Les trichothécènes sont produites du mévalonate (figure 11).



**Figure 11:** Biosynthèse de quelques mycotoxines dans les aliments (Leyral et vierling, 2001)

Les mycotoxines sont très stables et difficiles à éliminer, et peuvent provoquer des maladies chez les plantes, les animaux et les humains (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005; Dragacci et Grosso, 2005). Selon les recherches, certaines bactéries lactiques, et principalement les espèces du genre *Lactobacillus*, peuvent inhiber la production de mycotoxines (Luchese et Harrigan, 1990; Gourama et Bullerman, 1995; Haskard *et al.*, 2001). L'inhibition de la synthèse se fait par des composés de faible poids moléculaire, appelés protéiques, libérés après la lyse cellulaire

ou pendant la croissance, sensibles à certaines enzymes protéolytiques et à haute température (Coallier-Ascah et Idziak, 1985; Gourama, 1991). Certains dipeptides cycliques peuvent également intervenir à ce mécanisme (Ström, 2005). Plusieurs bactéries lactiques ont été jugées capables de se lier aux mycotoxines, et la liaison semble être au niveau du peptidoglycane et des polysaccharides de la paroi cellulaire (Haskard *et al.*, 2001; Dalié *et al.*, 2010). L'interaction entre les bactéries lactiques et les mycotoxines a évidemment plusieurs origines possibles: stimuler ou l'inhiber de la synthèse des mycotoxines, voire dégrader ou fixer les mycotoxines.

### 2.12 La lutte contre *Aternaria*

L'alternariose réduit considérablement les rendements à la fois qualitatifs et quantitatifs. Il n'existe pas de lutte curative pour contrôler le développement et l'extension de la maladie. L'ensemble de la « lutte » se basera sur la prophylaxie et les mesures préventives.

La brûlure précoce peut être contrôlée par trois mesures: les pratiques culturales, le traitement fongicide et l'utilisation de variétés résistantes. Les pratiques culturales et les traitements fongicides sont des pratiques plus courantes (Pragya, 2017; El-Nagar *et al.*, 2020).

Les bonnes pratiques culturales contribuent à minimiser l'incidence et la propagation de la maladie, elles comprennent: L'utilisation des tubercules sains (le champignon peut être transmis par les semences). Eviter les stress nutritionnels qui provoquent une sénescence accélérée. Limiter la conservation de l'inoculum en éliminant les débris de culture. Le choix des variétés moins sensibles. Les pratiques culturales comprennent le maintien d'un champ sain et de la vigueur des cultures, l'assainissement, l'élimination des vignes et des fruits infectés, des débris végétaux et des mauvaises herbes spontanées à proximité du champ, la rotation des cultures et réduire l'humidité des feuilles grâce à des systèmes d'irrigation orientés vers le sol (Pragya, 2017; El-Nagar *et al.*, 2020).

Cependant, la pratique culturelle à elle seule n'est pas suffisante pour contrôler la brûlure précoce.

Plusieurs types de fongicides ont été développés pour lutter contre la brûlure précoce, mais le traitement fongicide n'est ni économiquement réalisable ni écologiquement rationnel. Les fongicides sont d'abord appliqués 1 à 2 jours après la transplantation, puis nécessitent une application de routine à l'intervalle de 7 à 10 jours pour un contrôle efficace, là en augmentant les coûts de production et la pollution de l'environnement. Les fongicides ne fonctionnent

souvent pas sous une forte pression de maladie. L'utilisation fréquente de fongicides entraîne également l'émergence de nouveaux isolats résistants aux fongicides en raison de la pression de sélection élevée (Pragya, 2017; El-Nagar *et al.*, 2020).

### 2.12.1 Lutte biologique

La protection biologique qui fait intervenir quelques microorganismes semble exploitable en vue de développer une lutte biologique contre les champignons *Alternaria* pathogènes des brassicacées, mais leur utilisation est très marginale. Des travaux rapportent ainsi l'effet antifongique exercé par des bactéries du genre *Streptomyces* sur *A. brassicicola* à la fois au laboratoire et au champ (Valkonen et Koponen, 1990). Igarashi *et al.* (2000) ont notamment isolé un métabolite produit par *Streptomyces* sp, appelé fistupyrone, qui inhibe *in vitro* le développement d'*A. brassicicola* et limite la contamination des plantules. Des souches de *Bacillus polymyxa* isolées de semences de chou-fleur et les champignons antagonistes *Trichoderma harzianum* et *Gliocladium roseum* présentent également un intérêt potentiel comme fongicides naturels efficaces pour contrôler *A. brassicicola* (Sivapalan, 1993; Pichard et Thouvenot, 1999). Muto *et al.* (2006) ont montré que des extraits racinaires de la plante *Solanum nigrum*, contenant essentiellement des saponines, inhibent fortement la germination des conidies d'*A. brassicicola* suggérant une éventuelle utilisation de ces produits naturels dans le contrôle de l'alternariose.

# **CHAPITRE II**

## **MATERIELS ET METHODES**

## CHAPITRE II : Matériels et Methodes

### 1. Les bactéries lactiques

#### 1.1 Provenance des échantillons et échantillonnage

Un total de 40 échantillons de lait cru de chamelle (n = 15), de vache (n = 15) et de chèvre (n=10), ont été collectés au cours de deux années d'étude (2014-2015) dans 3 régions différentes d'Algérie (Bechar, Oran et Relizane) (**figure 12**).

Quinze (15) échantillons du lait de chamelle proviennent de Bechar de la région Abadla (pelage foncé), ont été prélevés le 9 novembre 2014, les échantillons du lait de chèvre provenaient d'Oran de Messerghin Hai Rabah (pelage claire de couleur blanche et/ou noir) où quinze (15) échantillons étaient collectés le 06 février 2015, et dix (10) échantillons du lait de vache ont été collectés le 15 Avril 2015 de Relizane. Les échantillons prélevés dans des flacons stériles ont été soumis aux analyses de température et du pH puis ils ont été transportés au laboratoire de microbiologie appliquée dans un récipient isotherme pour procéder à l'isolement et au dénombrement des bactéries lactiques (**tableau 03**).

L'alimentation des chameaux de cette région est basée principalement sur les plantes de Sahara: *Acacia raddiana Savi* (Talha), *Artemisia herba alba Asso* (Chih), *Euphorbia guyoniana Boiss. Rent.* (Moulbina), *Trananurn nudatum Del.* (Damrane), *Retanta retarn Webb.* (Rtam) (**Maiza et al 1993**).

**Tableau 03:** Date de collecte, et nombre des échantillons de lait cru et leur Régions

Lait	Régions	Nombre d'échantillons	Date
Lait de chamelle	Bechar (Abadla)	15	9 Novembre 2014
Lait de chèvre	Oran Messerghin Hai Rabah	15	06 Février 2015
Lait de vache	Relizane	10	15 Avril 2015



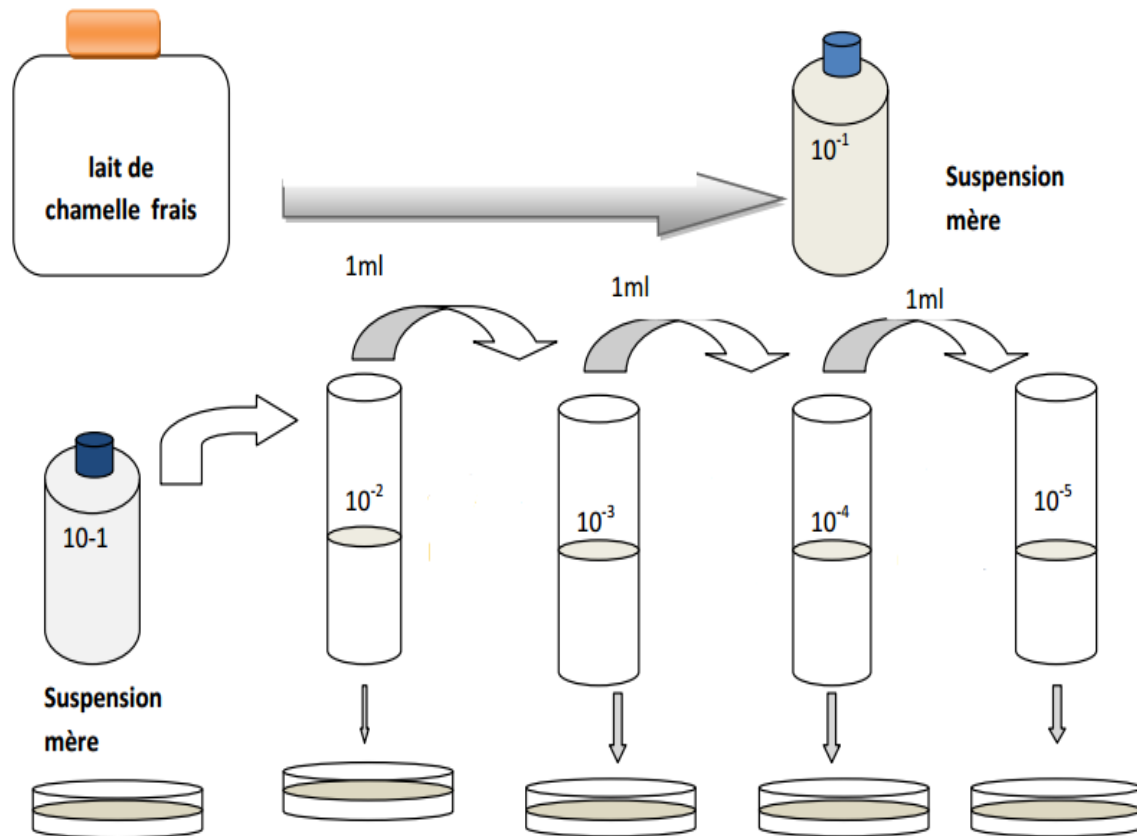
**Figure 12:** Échantillonnage à partir de lait cru de chamelle, de chèvre, et de vache (Photos prise par l'auteur). Période (2014-2015)

### 1.2 Isolement et dénombrement des bactéries lactiques

Après avoir préparé les dilutions de lait de  $10^{-1}$  jusqu'au  $10^{-8}$ , 1 ml de chaque dilution de  $10^{-6}$  jusqu'au  $10^{-8}$  a été utilisé pour un ensemencement en profondeur de milieu de culture sélectif pour la croissance des bactéries lactiques. Nous avons utilisé les milieux de culture MRS (Condalab, Madrid, Spain) (De Man *et al.*, 1960) et M17 (Condalab) (Terzaghi et Sandine, 1975), soit sous forme liquide ou solidifiés par l'ajout de 2% d'agar tel que décrit par la Fédération internationale de laiterie (IDF, 1996).

Par la suite, les isolats testés comme étant Gram positif et catalase négatif ont été cultivés sur milieu MRS liquide et solide (ou M17 liquide et solide) de manière successive jusqu'à

l'obtention de cultures pures. De 7 à 10 colonies isolées ont été prélevées dans le milieu MRS solide (ou solide M17) et transférées dans MRS liquide (ou M17 liquide) et vice versa. La pureté des souches a été vérifiée par l'aspect des colonies (forme, couleur, taille) sur milieu solide, aspect caractéristique des cultures en milieu liquide et par examen microscopique.



**Figure 13:** Protocole d'isolement et dénombrement des bactéries lactiques

### 1.3 La conservation des bactéries lactiques

#### 1.3.1 La conservation à courte terme

La conservation des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après 18 heures d'incubation à 30°C, les tubes sont conservés à 4°C. Le renouvellement des cultures se fait toutes les trois semaines (Saidi *et al.*, 2002).

#### 1.3.2 La conservation à long terme

A partir des jeunes cultures (18h) sur milieu liquide, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000  $\times$ g pendant 10 min. Une fois le surnageant est éliminé, on ajoute le milieu de conservation sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé, 0,2% d'extrait de levure et 30% de glycérol. Les cultures sont conservées en suspension dense dans des tubes

Eppendorf à -20°C. En cas de besoin, les cultures sont repiquées dans le lait écrémé à 0,5% d'extrait de levure, avant utilisation (**Saidi *et al.*, 2002; Guessas et Kihal, 2004**).

#### **1.4 Identifications des isolats**

Les colonies obtenues après l'isolement des bactéries lactiques sont d'abord examinées macroscopiquement puis microscopiquement par une coloration de Gram. Les analyses entamées nous permettent de classer les isolats en différents genres. Pour l'identification au niveau des espèces, les tests biochimiques s'avèrent nécessaires pour mener à bien cette tâche.

##### **1.4.1 La coloration de Gram**

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries, quelques gouttes ont été déposées sur un frotti fixé et laissées pendant 1mn, après rinçage à l'eau distillée, quelques gouttes de la solution aqueuse d'iodure de potassium iodée « Lugol » ont été déposées et laissées pendant 30 secondes. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool 90° et ensuite rincées à l'eau distillée. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries Gram+ gardent la coloration violette, les bactéries Gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette (**Baldent, 1997**). De manière à visualiser les bactéries Gram (-), on recolore avec de la fuch sine de Ziehl (rose) ont été versées sur la lame et laissées pendant 30 secondes. Les bactéries Gram (+) resteront violettes alors que les Gram (-) seront maintenant teintées en rose. Bien que le résultat de la coloration de Gram puisse dépendre de l'état physiologique des bactéries (âge de la colonie, conditions de croissances...), elle reste cependant la technique de coloration de base de la bactériologie (**Larpen t et Larpen t, 1990**).

##### **1.4.2 Caractérisation biochimique et physiologique**

###### **1.4.2.1 Recherche de la Catalase**

Ce test a été utilisé afin de faire la différence entre les bactéries à catalase positive et les bactéries à catalase négative, la présence de la catalase se traduit par l'apparition de bulles d'oxygène lors du contact de la bactérie avec l'eau oxygéné H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nous avons déposé sur une lame une goutte d'eau oxygénée puis, à l'aide d'une anse, la suspension bactérienne ou l'inoculum bactérien à partir de la colonie isolée a été ajoutée et mise en contact avec la goutte d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'apparition ou non de bulle de gaz sur la lame témoigne respectivement la présence ou non de la catalase dans le métabolisme de la bactérie (**Stiles et Holzapfel, 1997**).

###### **1.4.2.2 La croissance en présence de NaCl (4% et 6,5%)**

Un caractère spécial des bactéries lactiques est leur aptitude à résister à certaines concentrations

de sel (NaCl). Ce test permet de mettre en évidence la croissance ou non de certaines espèces sur milieu M17 en présence de NaCl à différentes concentrations. Pour cela les isolats sont mis en culture dans le milieu M17 (**annexe 1**) additionné du NaCl (4% et 6,5%) pendant 48h d'incubation. Les lactocoques ne poussent pas en présence de 6,5% de NaCl; ce test permet de séparer les lactocoques (streptocoques lactiques), des entérocoques (streptocoques fécaux) (**Devriese et al., 1993; Guiraud, 1998; Badis et al., 2004**).

#### **1.4.2.3 La croissance à pH alcalin et acide**

La croissance des isolats présumés lactobacilles a été testée à pH 4 et 9,6 ; par ailleurs, celle des Leuconostocs a été faite à pH 4,8 et 9,6. La croissance bactérienne a été évaluée par la présence ou l'absence de trouble dans les bouillons MRS (**Guiraud, 1998**).

#### **1.4.2.4 La thermorésistance**

La thermorésistance est réalisée uniquement pour les cocci, sur MRS liquide (**annexe 1**) et solide (ou M17 liquide et solide) à une température de 60°C pendant 30 min (**Samelis et al. 1994**). Pour les souches qui se sont développées après ce traitement le test a été refait à 63,5 °C pendant 30 min (**Stiles et Holtzapfel, 1997; Klein et al., 1998; Badis et al., 2005**).

La croissance à 10°C et à 45°C a été également effectuée afin de classer les bactéries en mésophiles ou thermophiles.

#### **1.4.2.5 La recherche de l'Arginine Dihydrolase (ADH)**

La recherche de cette enzyme a été faite sur le milieu M16BCP (**annexe 1**). Un milieu qui contient du lactose, de l'arginine et le pourpre de bromocrésol, les BL qui métabolisent le lactose vont acidifier le milieu donnant une coloration jaunâtre. D'autres isolats ayant la capacité de métaboliser l'arginine vont alcaliniser le milieu en libérant de l'ammoniac et la citrulline à partir d'arginine changeant ainsi la couleur du milieu de jaune en violet (**Thomas, 1973**).

#### **1.4.2.6 Test d'hydrolyse de l'esculine**

L'hydrolyse de l'esculine est détectée par le noircissement du bouillon MRS modifié contenant 0,5 % d'esculine et 0,05 % de citrate ferrique ammoniacal, la lecture est faite par rapport à un témoin non ensemencé après 24h à 48h.

#### **1.4.2.7 Détermination du type fermentaire**

Ce test permet de classer les bactéries en hétérofermentaire ou homofermentaire. Le type fermentaire, par définition, l'hétérofermentation est la capacité des bactéries lactiques à produire des molécules différentes du lactate telles que le CO<sub>2</sub>, l'acétate, l'éthanol à partir de la dégradation des sucres.

Afin de déterminer le type fermentaire, 100 µL des cultures bactériennes ont été inoculés dans un bouillon MRS ou M17 contenant une cloche de Durham (**Harrigan et McCance, 1976**;

**Garvie, 1984; Schillinger et Lücke, 1987).** Le bouillon contenant la souche est recouvert de paraffine et l'ensemble est mis à incuber à 30°C pendant 24h. Les tubes sont observés pendant 3 à 5 jours en fonction de l'aspect du milieu (trouble), le décollement de la paraffine, et le dégagement gazeux dans la cloche. Afin de séparer les lactobacilles homofermentaires strictes des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, un milieu MRS additionné au gluconate à la place de glucose a été utilisé.

#### **1.4.2.8 Détermination de l'espèce**

##### ***a- Profil fermentaire des carbohydrates***

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. Le test est réalisé en tube contenant 10 ml de bouillon MRSBCP-EV (**annexe 1**) sans sucres, sans extrait de viande additionnés de pourpre de bromocrésol (0.04g/l) comme indicateur de pH et additionné de 1% des sucres suivants (arabinose, ribose, xylose, galactose, fructose, mannitol, sorbitol, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, saccharose, trehalose, raffinose et esculine). Ce test est réalisé dans des mini préparations en plaque ELISA (**Boumehira et al., 2011; Guessas et al., 2012**).

Les isolats ont été cultivés pendant 18h dans du bouillon MRS puis centrifugés à 8000×g pendant 10 mn. Ensuite, 1,5 ml de tampon phosphate stérile ont été rajoutés au culot pour une deuxième centrifugation afin d'obtenir un culot cellulaire pur dépourvu des constituants du milieu de culture (MRS), le lavage a été fait à deux reprises. Par la suite, 1,5 ml du milieu MRSBCP-EV ont été additionnés au culot et le tout a été bien homogénéisé. Après, 50 µL des solutions cellulaires ont été déposées dans les puits des plaques Elisa contenant 50 µL de sucre et 200 µL du milieu MRSBCP-EV préalablement distribués selon le schéma décrit dans l'étude de **Guessas (2007)**. Finalement une goutte d'huile de paraffine a été rajoutée dans chaque puits afin de créer les conditions d'anaérobiose et les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48h.

La lecture des résultats a été faite après 24h et 48h d'incubation et les résultats ont été comparés au témoin sans bactéries et témoins sans sucres (**Guessas, 2007**), la fermentation des sucres apparaît par un virage de couleur, du pourpre au jaune.

##### **b- Caractérisation technologique**

###### ***b-1 Production des composés aromatiques***

La production d'acétaldéhyde (acétyl méthyl méthanol) a été testée sur des milieux Clark et Lubs (**annexe 1**). Les souches sont cultivées sur ce milieu. Après 24 heures d'incubation, le test a été réalisé par la réaction de Voges-Proskauer appelée réaction V.P (**Avril et al., 1992**). Dans un tube à hémolyse, 2 ml de cette culture sont transférés, d'hydroxyde de sodium à 16% (NaOH) dans de l'eau distillée (VP1) et 0,5 ml de réactif  $\alpha$ -naphtol à 6% dans l'alcool absolu (VP2). On

agite soigneusement les tubes et on laisse au repos à température ambiante pendant 5 à 10 min. La production d'acétoïne se traduit par l'apparition d'un anneau ou la diffusion en rose à la surface du milieu (Zourari *et al.*, 1992; Djadouni et Kihal, 2012).

### ***b-2 Production de dextrane***

La production du dextrane à partir du saccharose est mise en évidence en utilisant un milieu solide MSE (annexe 1) qui estensemencé par striation puis incubé pendant 48h à 30°C (Zarour *et al.*, 2012). Les souches productrices de dextrane se caractérisent par la formation de colonies larges, visqueuses et gluantes.

### ***b-3 Utilisation du citrate en présence de sucre fermentescible (glucose)***

La dégradation du citrate est étudiée sur milieu Kempler et Mc Kay (1980) (annexe 1) après repiquage des isolats. Ce milieu contient une solution de ferricyanide de potassium et une solution de citrate ferrique. La présence du citrate dans le milieu inhibe la réaction entre l'ion ferrique et le ferricyanide de potassium. La fermentation du citrate est recherchée sur le milieu de Kempler et McKay (KMK) (annexe 1) qui estensemencé par striation puis incubé pendant 48h à 72h à 30°C. La capacité de fermenter le citrate par les souches testées est révélé par l'obtention de colonies bleues, si les isolats ne métabolisent pas le citrate, les colonies resteront de couleur blanche.

De nature le citrate inhibe les réactions ioniques entre le fer et le potassium de ferricyanide.

## **1.5 Caractérisation moléculaire des souches bactériennes**

Les examens macroscopiques et microscopiques étant réalisés, les tests Gram positif, test de catalase, et des tests physiologiques et biochimique des différents isolats nous ont permis une identification préliminaire, donc l'identification des microorganismes par les méthodes de la biologie moléculaire est devenue une méthode incontournable.

Ce travail a été réalisé au laboratoire BATT, (Département de chimie, sciences biologiques, pharmaceutiques et environnementales, Université de Messine, Italie).

### **1.5.1 Extraction de l'ADN génomique des souches bactériennes sélectionnées**

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de souches bactériennes cultivées sur milieu gélose MRS à 30°C pendant 24h, selon la méthode de Rainey *et al.* (1996) avec quelques modifications.

Une seule colonie a été dispersée dans 400 µl de tampon salin-EDTA (0,15 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 0,01 mol·l<sup>-1</sup> acide éthylène diamine tétra acétique, EDTA; SigmaAldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Ensuite, 10 µl d'une solution de lysozyme (10 mg·ml<sup>-1</sup>; Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) ont été ajoutés. La préparation résultante a été vortexée et incubée à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, 5 µl de protéinase K (20 mg·ml<sup>-1</sup>; Invitrogen) et 15 µl de dodécylsulfate de

sodium à 25% (SDS, Invitrogen) ont été ajoutés, suivis d'une incubation pendant 30 min à 55°C. Après centrifugation à 15000 ×g pendant 5 min, 400 µl de phénol (Merck, Darmstadt, Allemagne) ont été ajoutés à la préparation et le mélange a été centrifugé à 15000 ×g pendant 5 min. Le surnageant a été recueilli dans un nouveau tube Eppendorf et un volume égal de phénol-chloroforme (4:1) (Merck) a été ajouté. Ensuite, la préparation a été soigneusement mélangée, en retournant le tube Eppendorf plusieurs fois, et centrifugée. La précipitation de l'ADN a été obtenue en ajoutant 1 ml d'éthanol absolu (Sigma-Aldrich) à -20°C au surnageant et en incubant à -80°C pendant 1h. Après centrifugation à 4°C pendant 10 min à 15000 ×g, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 1ml d'éthanol refroidie (-20°C) à 70%, séché et dissous dans 30 µl de Tris-EDTA (TE) (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Le traitement à la RNase a été réalisé en ajoutant 1 µl de RNase (20 µg·ml<sup>-1</sup>; Invitrogen) en incubant pendant 1h à 37°C. Enfin, les échantillons ont été conservés à -20°C. L'extrait d'ADN a été vérifié par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% coloré au bromure d'éthidium dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) (Promega).

### 1.5.2 Vérification qualitative d'extrait d'ADN

Afin de vérifier la qualité de l'ADN après extraction, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% des différents extraits ADN a été réalisée suivi d'une visualisation sous lumière UV. Si les ADN migrent sous la forme d'une trainée (*smear*), l'échantillon d'ADN a sans doute subi une dégradation majeure.

### 1.5.3 Analyse d'espaceurs internes transcrits (ITS-PCR)

L'amplification de l'espaceur transcrit interne (ITS) et l'analyse des profils ont été réalisées comme décrit ci-dessous:

Les mélanges de réaction en chaîne de polymérase (PCR) (volume final, 50 µl) contenaient 5 µl de tampon 10X, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol·l<sup>-1</sup>), 4 µl de mélange de désoxynucléoside triphosphate (10 mmol·l<sup>-1</sup>; tous de Promega), 1 µl de chaque amorce (12 pmol; Invitrogen), 5 µl de polymérase Taq (Promega) et 2 µl de solution d'ADN matrice. La paire d'amorces utilisée était la référence **F1429 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')** et **R188 (5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3')**, le producteur doit être indiqué. L'amplification a été réalisée dans T-Personal Thermal Cycler (Biometra, Göttingen, Allemagne) en utilisant le programme de température suivant: dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 31 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, recuit à 55°C pendant 1 min, élongation à 72°C pendant 1 min 30 sec et une extension finale à 72°C pendant 7 min.

#### **1.5.4 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits de PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Les profils ont été examinés à l'aide du logiciel Kodak Digital Science 1d 2.0 (Kodak, Rochester, New York, USA), l'analyse a été réalisée sur la base du nombre et de la taille des bandes par rapport à un marqueur d'échelle ADN de 50 pb (Invitrogen). Les souches ayant le même profil ITS ont été regroupées et à partir de chaque grappe, des souches aléatoires ont été sélectionnées et identifiées par extraction d'ADN et séquençage de l'ADNr 16S.

#### **1.5.5 Préparation du gel d'agarose (annexe 2)**

2% d'agarose est préparé avec le tampon TBE en présence du BET (bromure d'éthidium).

#### **1.5.6 Dépôt des échantillons (produits d'amplification)**

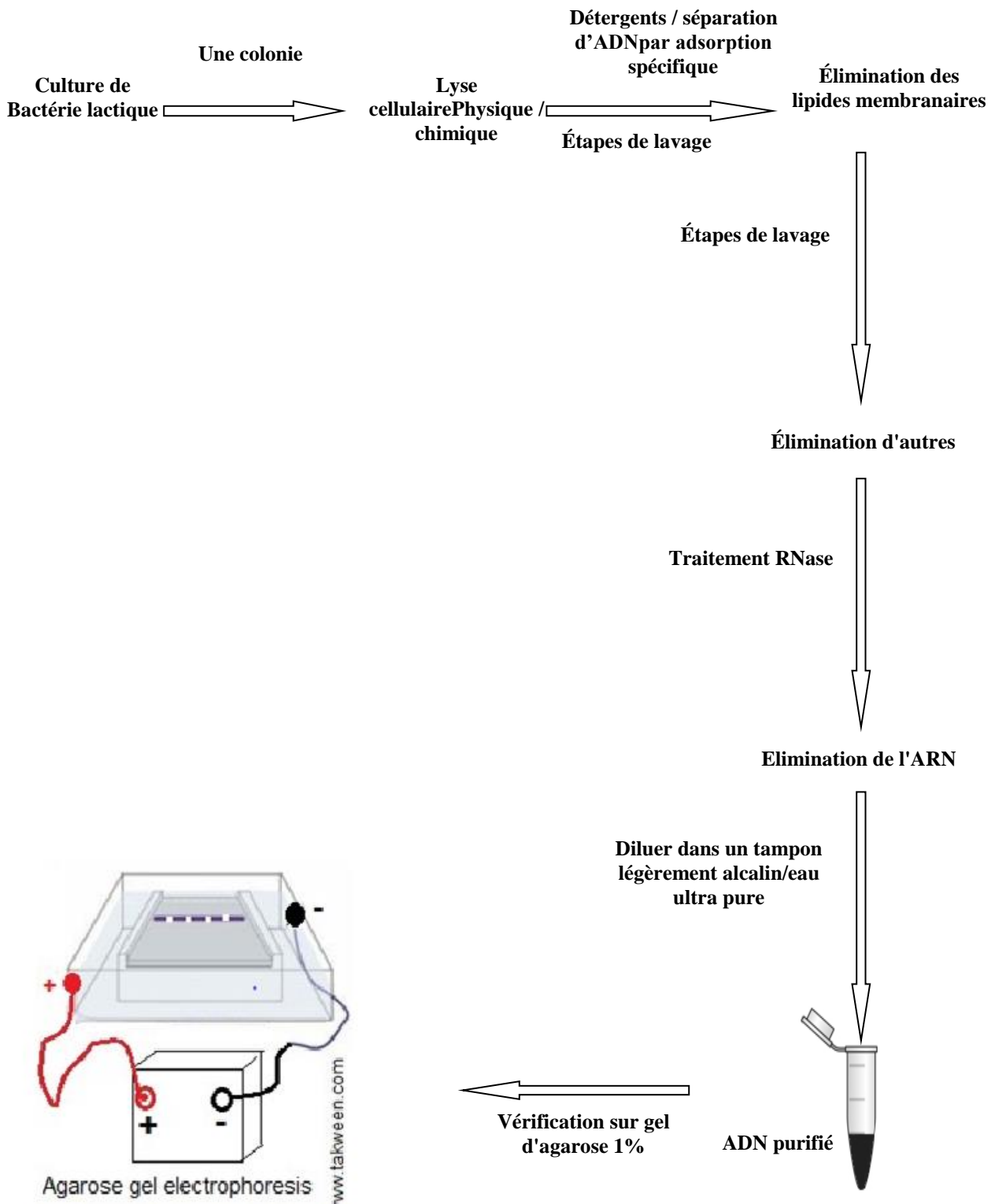
Dépôt de mélanger la solution de charge (bleu de bromophénol et glycérol) avec l'ADN sur une petite plaque (20 µl d'ADN et 5 µl de tampon de chargement 6x), et mélange des marqueurs : 4µl de marqueurs, 2µl de bromure d'éthidium et 12µl de tampon de charge avec une micropipette.

##### **1.5.6.1 Migration**

Fermer la cuve, brancher les fils et exercez un voltage de 80 volts, puis laisser migrer (environ 60 minutes), Une fois le témoin de migration (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, on arrête la migration.

##### **1.5.6.2 Visualisation**

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose a été examinée à l'aide du logiciel Kodak Digital Science 1d 2.0 (Kodak, Rochester, New York, USA)



**Figure 14:** Différentes étapes suivies durant l'extraction d'ADN, et l'électrophorèse sur gel d'agarose

### 1.5.7 Identification des isolats de LAB par séquençage partiel de l'ADNr 16S et analyses phylogénétiques

Le gène de l'ADNr 16S partiel a été amplifié selon le protocole décrit par **Krakova *et al.* (2015)**, en utilisant les amorces universelles **F27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')** et **R1492 (5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3')**; tous deux Invitrogen).

La purification des amplifiât a été réalisée par dilution de l'ADN avec une solution TE Buffer et my MixTaq (**annexe 2**) pour obtenir une bonne amplification, ce dernier permet d'éliminer le reste des composants issus de la réaction PCR qui risquent d'influencer négativement le bon déroulement du séquençage. La purification et le séquençage des produits de PCR ont été réalisés par une installation commerciale (Biofab, Rome, Italie).

### 1.5.8 Traitement et analyse phylogénétique des séquences

Le séquençage des produits PCR va permettre d'obtenir pour chacune des souches deux séquences brutes qui correspondent respectivement aux brins amplifiés par l'amorce **27F** et **1492R**.

### 1.5.9 Nettoyage et assemblage des séquences

Le traitement des séquences brutes a été effectué à l'aide d'un logiciel FinchTV. Une vérification et repérage d'éventuelles erreurs commises lors du séquençage vont être effectuée avec le logiciel FinchTV qui permet de visualiser les chromatogrammes qui présente les pics et les bases correspondantes qui constituent la séquence obtenue et de passer l'information à partir du séquençage de chaque chaîne au format FASTA33 et/ou BLAST.

Une révision manuelle des erreurs repérées sur les chromatogrammes des séquences a été réalisée, ces erreurs (mauvais pics) se produisent principalement au début et à la fin de ce processus du séquençage.

### 1.5.10 L'alignement et analyse bio-informatique des séquences d'ADN

Une fois les séquences nettoyées et assemblées, les plus proches parents des isolats de bactéries lactiques ont été déterminés par comparaison avec les séquences de gènes d'ADNr dans les bases de données NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA) et EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute, Hinxton, Royaume-Uni) par la recherche de l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST).

### 1.5.11 Analyse phylogénétique

La phylogénie permet la comparaison et le rapprochement des séquences en se basant à la fois sur des paramètres purement mathématiques et statistiques et sur des données biologiques d'évolution. Les séquences ont été alignées avec des séquences d'ADN étroitement similaires extraites de GenBank. L'arbre phylogénétique a été construit par le logiciel d'analyse génétique évolutionnaire moléculaire MEGA7.0 (Kumar *et al.*, 2016) en utilisant la méthode de l'algorithme de voisinage et le modèle Kimura à 2 paramètres, avec 1000 répliques bootstrap (Felsenstein, 1985).

## 2 Le parasite

### 2.1 Provenance des échantillons et échantillonnage

Un total de 27 échantillons est prélevé à partir des organes présentant des symptômes (feuilles, tiges, fruits, racines ou tubercules infectés) de tomates et de carottes présentant des phénomènes évidents de détérioration fongique ont été collectés au cours des deux années de l'étude (2014-2015) (figure 15) dans des champs sélectionnés au hasard dans la région de Mostaganem en Algérie (tableau 04).

**Tableau 04:** Différentes régions géographiques d'échantillonnage.

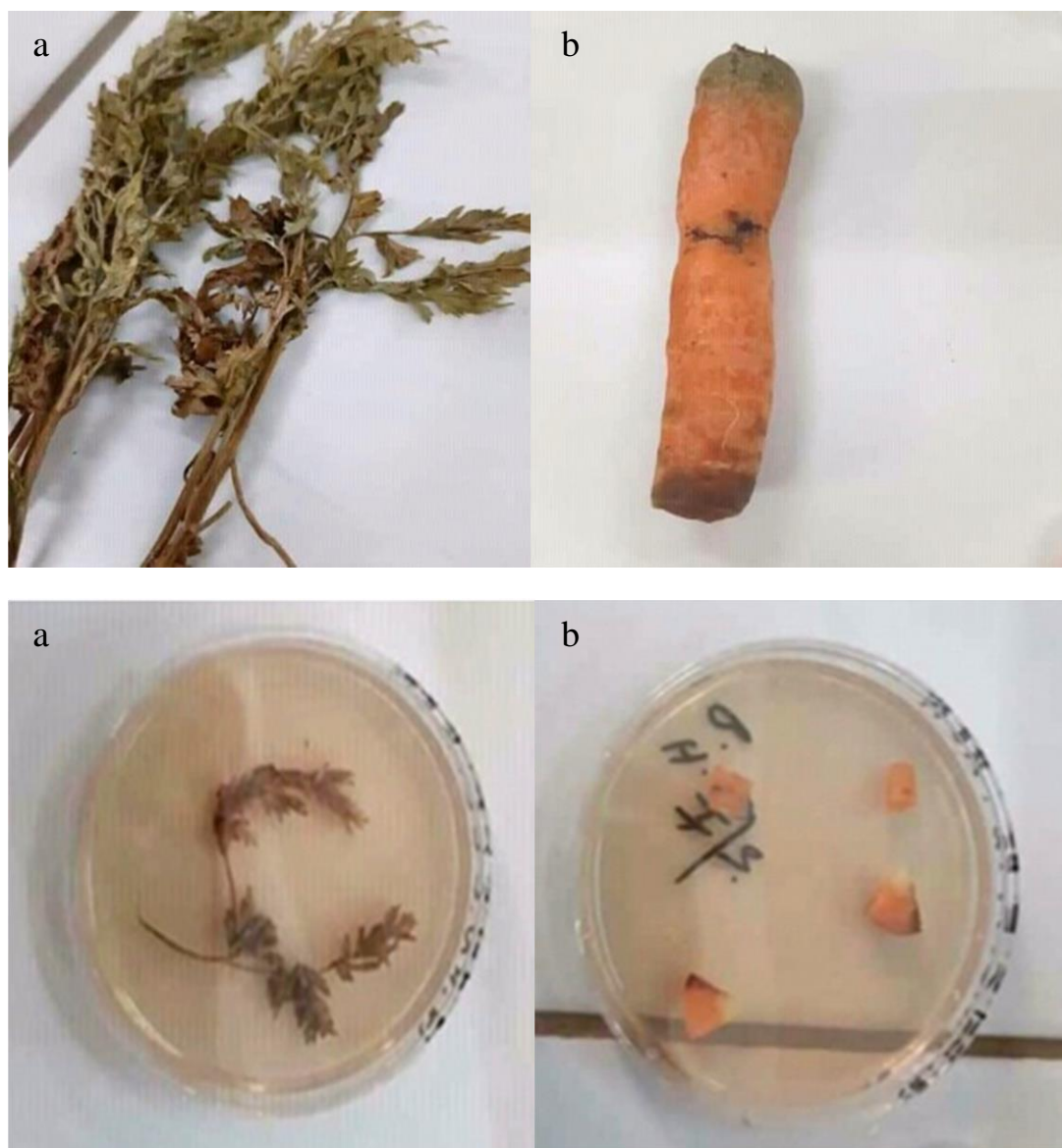
Région géographique	Wilayas
Sidi Ibrahim	Mostaganem
Yanarou	
Aiada	
Stidia	
Oualed bachir	
Achachaa	



**Figure 15:** Échantillonnage à partir des plantes de tomate et carotte présentant des symptômes de la maladie d'*Alternaria* (Photos prise par l'auteur). Période (2014-2015)

## 2.2 Isolement et purification de l'agent pathogène

L'isolement fongique a été réalisé comme décrit par **Sinclair et Dhingra (1995)**. Le matériel végétal présentant des lésions brunes ou noires (**figure 16, 17**) a été coupé en morceaux de 2 cm et la surface a été stérilisée dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,1% (v/v) pendant 2 min pour éliminer la flore saprophyte superficielle puis rincés trois fois dans de l'eau distillée stérile. Les tissus végétaux sont ensuite séchés sur du papier filtre stérile. Ces fragments ont ensuite été transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu de gélose dextrose de pomme de terre (PDA) (**annexe 1**); Oxoid, Basingstoke, Royaume-Uni) supplémenté en streptomycine (150 mg·l<sup>-1</sup>, Merck) et incubés pendant 5 à 8 jours à 25 ± 2°C. Les hyphomycètes fongiques avec des caractéristiques micro- et macro- morphologiques correspondant au genre *Alternaria* ont été transférés dans du milieu PDA et incubés à 25 ± 2°C pendant 4 jours. L'isolement des cultures pures a été effectué sur la base des caractéristiques culturelles morphologiques macroscopique des espèces d'*Alternaria* (**Simmons, 2007**), et en utilisant la méthode de culture monospore (**Djerbi, 1990**). Des sous-cultures successives des colonies fongiques suspectes sur milieu PDA ont été réalisées jusqu'à l'obtention de colonies d'apparence pure.



**Figure 16:** Isolement à partir de la plante de carotte présentant des symptômes sur milieu PDA. (a) feuilles ; (b) racines.



**Figure 17:** Isolement à partir de plante tomate présentant des symptômes sur milieu PDA à partir de : (a) fruits ; (b) tiges ; (c) feuilles, (d) racines

### 2.3 Culture monospore ou clonage

Les isolats obtenus à partir des fragments des tissus malades peuvent renfermer des noyaux génétiquement différents (le mycélium récolté peut être hétérocaryotique ou représenter un mélange de plusieurs souches récoltés simultanément dans les plantes malade). Avant d'étudier chaque isolat, il doit donc être cloné (**Davaud, 1991**).

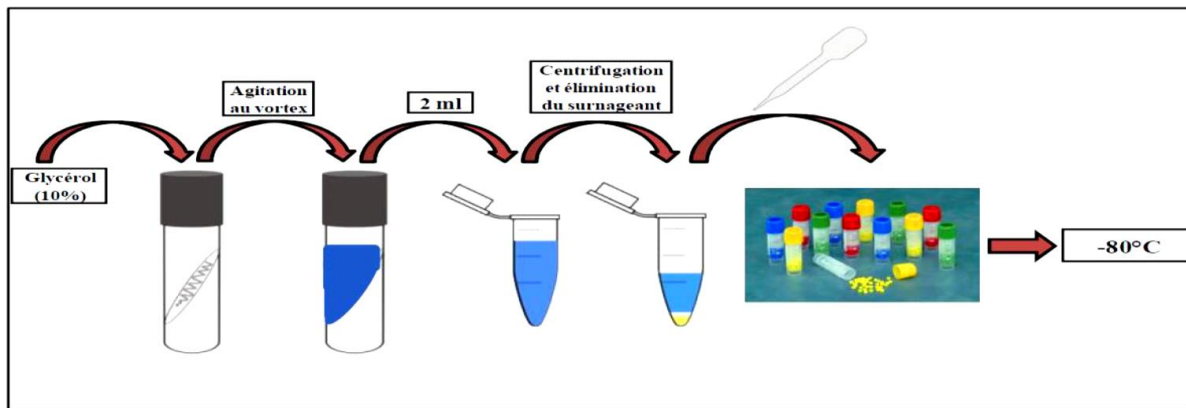
Le but de cette technique est d'obtenir un matériel fongique génétiquement homogène, les cultures monospores sont obtenues de la manière suivante dans des conditions stériles. Nous avons introduit un fragment de mycélium dans 9ml d'eau distillé stérile, après une agitation avec le vortex la suspension sporale est diluée pour minimiser le nombre de spores/ml. Une goutte de la suspension est étalée sur la surface du milieu gélosé 2% en boîte de Pétrie, après l'incubation et sous une loupe binoculaire, nous avons repiqués sur une autre boîte de Pétrie contenant un milieu PDA, les germinations issues d'une seule spore unique (**Buxton, 1954; El-Ani, 1968; Henni et al., 1994**). Après huit (08) jours d'incubation, le comportement de chaque thalle issu de la germination des macroconidies est observée (croissance, aspect du mycélium et pigmentation).

### 2.4 Repiquage du champignon

Après un bon développement des colonies, on effectue des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné. Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte. Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement. Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen.

### 2.5 Conservation des isolats

Pour conserver les isolats obtenus après purification, issues de culture monospore, on les maintient dans des tubes inclinés ou en boîte contenant soit le milieu PDA, soit le milieu gélose 2%, âgées de sept jours, les milieux inclinés pour agrandir la surface de culture, maintenues dans un réfrigérateur à 4°C pour des utilisations ultérieures (les basses températures augmentant considérablement la longévité des cultures) (**Rappily, 1998**). Ils peuvent également être conservés dans des cryotubes de 1,5ml contenant cinq implants mycéliens de 1 cm de diamètre supplémentés avec 1 ml de glycérol à 30%. Ces cryotubes sont placés dans un congélateur à -80°C pour un stockage à long terme.



**Figure 18:** Schéma du protocole de la conservation des champignons filamenteux par cryoconservation à l'aide de cryobilles.

## 2.6 Identification des isolats d'*Alternaria*

### 2.6.1 Etude des caractères cultureux et identification morphologique

La description des isolats fongiques était basée sur les caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) des colonies issues de la culture monospore, considérées comme « type sauvage ». L'identification des isolats sélectionnés a été réalisée selon les caractéristiques macro et micro morphologiques décrites par **Simmons (2007)**.

La culture sur différents milieux de culture est nécessaire afin d'évaluer les meilleures conditions de croissance des souches. Cette étude est réalisée par le dépôt d'un implant mycélien de chaque isolat âgé de 5 jours dans une boîte de Pétrie contenant quatre milieux de culture différents. Trois répétitions de chaque boîte avec les 4 différents milieux de culture pour chaque isolat. Les différents milieux utilisés sont :

- Un milieu minéral (Czapek) (**annexe 1**)
- Un milieu organique (OMA) (**annexe 1**)
- Un milieu d'Extrait Malth Agar (MEA) (**annexe 1**)
- Un milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (**annexe 1**)

L'aspect et la pigmentation des colonies sont relevés par observation visuelle et par observation sous microscope Stereo après 7 jours pour l'étude des caractères cultureux.

#### a- Etudes des caractères morphologiques macroscopiques

Après le choix du milieu et une culture du champignon de 7 jours sur PDA. Les examens macroscopiques ont été effectués Selon le protocole décrit par **Koenig, 1995**. L'examen des boîtes de Petri s'effectue à l'œil nu, incluant les caractéristiques morphologiques de la colonie, cette étude se base essentiellement sur la vitesse de croissance mycélienne sur surface, la nature

du mycélium (couleur et aspect du thalle). L'aspect du mycélium peut être ras muqueux, peu développé, d'aspect velouté, peu duveteux ou aérien à cotonneux, la consistance du mycélium, la pigmentation de colonies (de couleur marron, olivâtre à gris claire ou foncé selon les espèces et les morphotypes), et la sporulation, en fonction du temps de la colonie.

Même si les caractères macroscopiques de la colonie semblent évidents, il est difficile d'identifier ces pathogènes sur la base de ces seuls critères. De plus il est difficile de séparer les espèces pathogènes des espèces saprophytes. L'observation microscopique permet d'affiner le diagnostic, et de révéler les caractéristiques des spores. Les espèces d'*Alternaria* pathogènes présentent des spores qui sont différenciés généralement par la morphologie des conidies.

#### **b- Etudes des caractères microscopiques d'*Alternaria***

L'étude micromorphologique des champignons, utilisée pour l'observation des structures reproductrices du mycète et des modalités de conidiogénèse. Pour les spores d'*Alternaria* avec différentes tailles petites et grosses, il est difficile de séparer certaines espèces étroitement apparentées, comme *A. alternata*, *A. tenuissima* et *A. arborescens*. Donc pour caractériser l'espèce d'*Alternaria*, l'étude microscopique est impérative pour déterminer la taille et la forme des macroconidies, des microconidies, des chlamydo-spores et la formation des monophialides.

La culture sur lame est une technique appropriée pour l'examen direct au microscope (**Eyquen et al., 1998; Guiraud, 1998**). Sur une lame de verre nous déposons quelques gouttes du milieu gélose 2% (**Annexe1**) déposé sur un support en forme de U au fond d'une boîte de Pétri contenant quelques ml d'eau distillée stérile. La culture est incubée puis est observée sous le microscope optique aux différents grossissements. L'identification des espèces fongiques isolées est effectuée en utilisant les clés de l'identification de l'espèce de *Alternaria alternata* (**Messaen et Cassini, 1968; Booth, 1971; Nelson et al 1983**).

Une deuxième technique de culture sur la lame a été utilisée pour une bonne observation des caractères microscopiques des champignons, on a préparé une boîte de Pétri de 90 mm et un disque de papier filtre (tout les deux stérile) ; un porte-lame stérile utilisé comme support et une deuxième lame neuve et stérile doit être positionnée sur le dessus, en formant un plus (+), coupez un carré de 1 cm x 1 cm de milieu de culture du champignon avec un scalpel et placez-le sur la lame de verre.

Le microorganisme doit être inoculé avec une anse sur les côtés du milieu, ensuite déposer la lamelle sur le milieu inoculé, observer la croissance à des intervalles de temps, après incubation, la lamelle est placée sur une lame avec une goutte de lactophénol pour observation au M.O.

L'examen direct au microscope permet d'effectuer les mensurations (Longueur et Largeur) des microconidies, des macroconidies et des chlamydoconidies produites par les isolats d'*Alternaria*. Les mensurations ont été effectuées à l'aide d'un calcul de l'échelle (communication personnelle, Henni), toutes les observations sont effectuées au grossissement  $\times 400$ , des observations microscopiques complémentaires sur l'absence ou présence des chlamydoconidies sont faites.

La sporulation typique à chaque espèce est photographiée à l'aide d'un appareil photo Moticam. Pour l'étude morphologique des conidies, un examen approfondi est fait au grossissement  $\times 400$ . La taille et la forme des spores incluant le nombre de cloisons, la longueur et leur profondeur sont enregistrées.

## 2.7 Caractérisation moléculaire des souches fongiques

Les examens des caractères culturels macroscopiques et microscopiques étant réalisés, des différents isolats nous ont permis une identification préliminaire, donc l'identification du parasite par la méthode de la biologie moléculaire est devenue une méthode incontournable.

Pour identifier les espèces fongiques, nous avons utilisé des méthodes qui ont été employées pour l'identification des BL, à l'exception de quelques modifications, alors pour confirmer l'identification des espèces, l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification et le séquençage de l'ITS1, ITS2 et ADNr 5.8S ont été réalisés.

Ce travail a été réalisé au laboratoire BATT, Département de chimies, sciences biologiques, pharmaceutiques et environnementales, Université de Messina, Italie.

### 2.7.1 Extraction de l'ADN génomique des souches fongiques

L'ADN génomique a été extrait des souches fongiques cultivées sur milieu PDA à 27°C pendant 5 jours. Après une période d'incubation, environ 1 cm<sup>2</sup> de matière fongique a été transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml rempli de billes de verre (0,45-0,50 mm de diamètre) et 500  $\mu$ l de tampon de lyse (Tris-HCl 0,1 mmol l<sup>-1</sup>, pH 5,8; 10 mmol l<sup>-1</sup> EDTA; 2% SDS). Ceci a été suivi d'une agitation par le vortex 4 fois pendant 40 s. Ensuite, 25  $\mu$ l de NaCl 5 mol·l<sup>-1</sup> ont été ajoutés et la préparation a été mélangée 4 fois à l'aide du vortex pendant 40 sec et centrifugée pendant 3 min à 15 000  $\times$ g. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube Eppendorf et

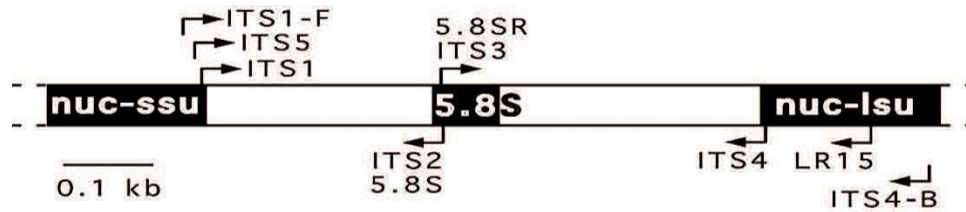
500 µl de tampon de lyse ont été ajoutés. Ensuite, le mélange a été vortexé 4 fois pendant 40 sec. Après centrifugation pendant 3 min à 15000 ×g, 400 µl de phénol (Merck) ont été ajoutés au surnageant. Le mélange a été soigneusement mélangé en retournant le tube Eppendorf plusieurs fois et centrifugé pendant 5 min à 15 000 ×g. Le surnageant a été transféré dans un tube Eppendorf et 400 µl de phénol-chloroforme (4:1) ont été ajoutés, et mélangés soigneusement en retournant le tube Eppendorf plusieurs fois, puis centrifugés pendant 5 min à 15000 ×g. Un volume de 1 ml d'éthanol absolu (-20°C) a été ajouté au surnageant et le tube Eppendorf a été inversé. Les échantillons ont été placés à -80°C pendant 1 h pour précipiter l'ADN. Après centrifugation à 4°C pendant 10 min à 15000 ×g, le surnageant a été éliminé et 1 ml d'éthanol froid (-20°C) à 70% a été ajouté au culot et centrifugé pendant 10 min à 15000 ×g. Le surnageant a été éliminé, le culot a été séché et dissous dans 30 µl de tampon TE. Le traitement à la RNase a été effectué en ajoutant 1 µl de RNase (20 µg·ml<sup>-1</sup>) et en incubant 1h à 37°C. Enfin, les échantillons ont été conservés à -20°C. L'extrait d'ADN a été vérifié par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% coloré au bromure d'éthidium dans du tampon TAE.

### 2.7.2 Amplification de la région ITS (espaceur interne transcrit)

La région ITS a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles ITS1 et ITS4, qui sont spécifiques des gènes d'ARNr fongiques ITS1, ITS2 et 5.8S (White *et al.*, 1990). Le mélange réactionnel contenait 0,48 mmol·l<sup>-1</sup> de chaque amorce (Invitrogen), 25 µl de MyTaq Mix 2x (annexe 2) (Bioline, Londres, Royaume-Uni) et 2 µl de solution d'ADN matrice dans le volume réactionnel total de 50 µl. La PCR a été réalisée avec le programme suivant: dénaturation de 5 min à 95°C, suivie de 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 90 s à 72°C, et l'extension finale a été effectuée à 72°C pendant 10 min dans le thermocycleur T-Personal. Les produits de PCR ont été analysés dans un gel d'agarose à 1,5% coloré au bromure d'éthidium.

### 2.7.3 Identification des souches fongiques par séquençage partiel de l'ADNr 5.8S et analyses phylogénétiques

La purification et le séquençage des produits PCR ont été effectués par une installation commerciale (Biofab). Les plus proches parents des isolats ont été déterminés par comparaison avec les séquences de gènes d'ADNr dans les bases de données NCBI GenBank et EMBL-EBI par recherche BLAST.



**Figure 19:** L'arrangement des gènes et des séquences inter géniques nucléaires dans la région d'ADNr et la localisation des ITS1 et ITS4.

#### 2.7.4 Numéros d'accès de séquence nucléotidique

Les séquences génétiques de l'ADNr 16S de neuf isolats bactériens ont été déposées dans les bases de données du NCBI et sont disponibles sous les numéros d'accès de MT672309 à MT672316 et MT703828. Les séquences génétiques de l'ADNr fongique ITS ont été déposées dans des bases de données NCBI et sont disponibles sous les numéros d'accès MT661476 à MT661480.

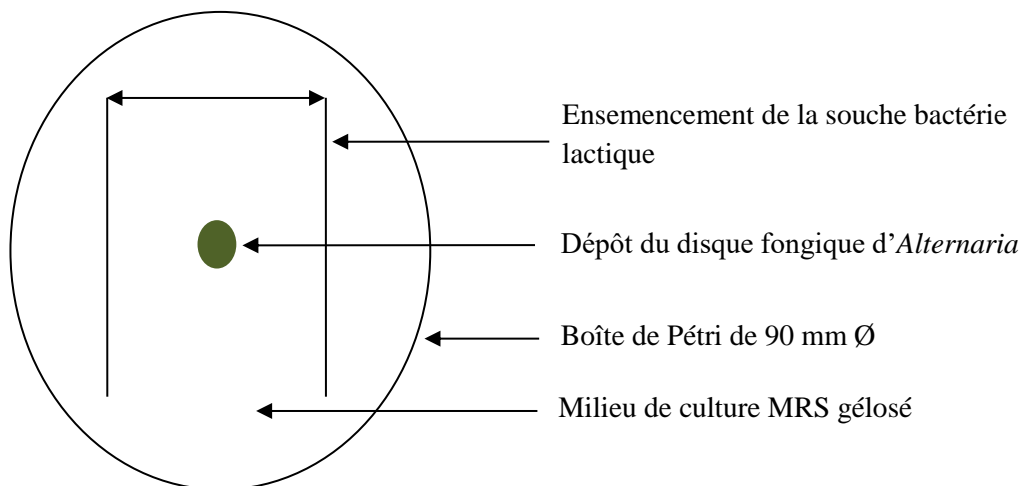
#### 2.8 Test d'activité antifongique

En premier lieu nous avons réalisé le test qualitatif par la méthode de confrontation.

Un total de 45 isolats bactériens, identifiés comme BL par des analyses biochimiques et physiologiques, ont été criblés pour l'activité antifongique contre 5 souches d'*A. Alternata* isolées à partir de légumes détériorés. Après 18h d'incubation, les souches de BL ont été striées en deux lignes espacées de 2 cm sur de la gélose MRS et incubées à 30°C pendant 48h. Ensuite, une coupe de souche fongique âgée de 5 jours a été déposée au centre des plaques d'agar et incubée à 30°C. Après 3 jours, le diamètre des colonies fongiques a été mesuré et comparé à un témoin, qui était une coupure de souche fongique peu claire, devrait être mieux expliqué déposé au centre de la plaque de gélose sans BL (Laref et Guessas, 2013). Le pourcentage d'inhibition de croissance (I) a été calculé comme suit:

$$I = \frac{R_w - R_t}{R_w} \times 100$$

Où  $R_w$  est la distance radiale maximale cultivée par le champignon phytopathogène dans le témoin sans BL et  $R_t$  est la distance radiale cultivée par le champignon phytopathogène en direction de l'antagoniste (en centimètres) (Wang *et al.*, 2002). Toutes les expériences ont été réalisées en triple et répétées trois fois.



**Figure 20:** Schéma démonstratif de la méthode de confrontation directe

Un deuxième test quantitatif par la Méthode des puits est réalisé sur 5 souches de BL qui présentaient une forte activité antifongique vis-à-vis 4 souches d'*Alternaria*.

Selon **Barefoot et Kaenhammer, (1983)** la méthode des puits est réalisée sur des souches de BL sélectionnées qui ont une forte activité anti fongique et présentent des substances inhibitrices, qui peuvent diffuser dans un milieu de culture solide. Les bactéries lactiques ont été repiquées dans du milieu liquide MRS et incubées pendant 18h à 30°C. Une centrifugation à 4°C à 4000 ×g pendant 15 min est réalisée après incubation. Des puits de 5 mm de diamètre sur milieu MRS solide inoculés par la suspension monosporelle de champignon, sont creusés à l'aide d'un emporte-pièce stérile (pipette pasteur), et seront remplies avec 100 µL de surnageant. Les boîtes de Pétri sont gardées à une température de +4°C durant 4h pour une bonne diffusion de la substance antimicrobienne (**Doumandji et al., 2010**). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h ; une zone d'inhibition formées autour des puits est examinée après l'incubation (**Hwanhlem et al., 2011**).

## 2.9 Caractérisation des métabolites antifongiques

Après un traitement du surnageant à différentes valeurs de pH et un traitement thermique, l'activité de bactériocine a été étudiée.

### 2.9.1 L'effet de la température

Etude de l'effet thermique sur le surnageant brut actif est réalisée à différentes température (4°C, 30°C, 45°C, 90°C) pendant 20 min (**Stiles et Holzapfel, 1997; Teuber et Geis, 2006**). Le chauffage est réalisé dans un bain-marie. L'étude se fait selon la Méthode des puits (méthode de **Barefoot et Kaenhammer, 1983**) décrite précédemment.

### 2.9.2 L'effet du pH

L'activité antifongique sur milieu MRS liquide a pH 2, 4, 6, 8 et 9, puis incubation pendant 18h à 30°C a été évaluée par la méthode des puits décrite par **(Barefoot et Kaenhammer, 1983)**.

### 2.9.3 L'effet des enzymes protéolytiques

L'effet des enzymes protéolytiques a été résolu selon la méthode décrite par **Hirsch (1979)**, 10 µl de l'enzyme [chymotrypsine, pepsine, lysozyme (1 mg/ml, préparé dans 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)] les enzymes ont été dissoute dans une solution de tampon, ajoutées au surnageant brut actif. 0.1 ml de la suspension monosporale sont ensuite versés sur la boîte contenant le milieu MRS solide. Les zones d'inhibition sont mesurées après trois jours d'incubation à 30°C, et comparé à un témoin non traité par les enzymes.

## **CHAPITRE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## Chapitre III : Résultats et Discussion

### 1 Caractérisation phénotypique des isolats bactériens

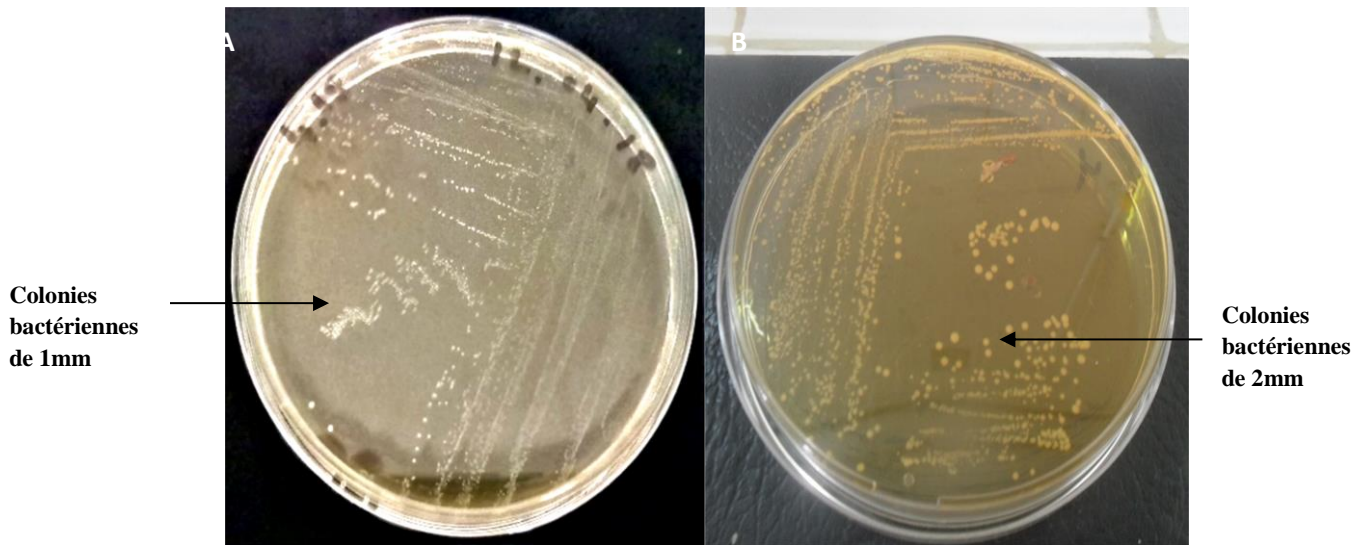
Les BL sont Gram positif, non sporulants, tolérants à l'air et à l'acide, organotrophes, fermentative, bâtonnet ou cocci produisant de l'acide lactique, le principal produit final métabolique de la fermentation des glucides (**Sadiq et al., 2019**). Ils ont une distribution omniprésente, étant généralement présents dans les produits laitiers (fermentés), la viande, les légumes, le sol, l'eau ainsi que dans les voies gastro-intestinale et urogénitale des humains et des animaux (**Liu et al., 2014**). Récemment, les BL ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la conservation des aliments, en raison de leur capacité à produire une pléthore de métabolites antifongiques et à éliminer les mycotoxines de l'alimentation humaine et animale (**Sadiq et al., 2019**).

Dans la présente étude, 123 bactéries Gram-positives et catalase-négatives ont été isolées à partir d'échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de chamelle. Parmi elles, 45 souches au total ont été identifiées comme bactéries lactiques (BL) à la suite des analyses morphologiques, biochimiques et physiologiques. Ils étaient Gram-positifs, catalase-négatifs et non sporulantes. Les colonies étaient petites de 1 à 2 mm, blanchâtres, transparentes, lisses, lenticulaires et régulières sur milieu solide. Les cellules avaient une forme de coccobacilles ou cocci, disposées en petites chaînes ou en diplocoques.

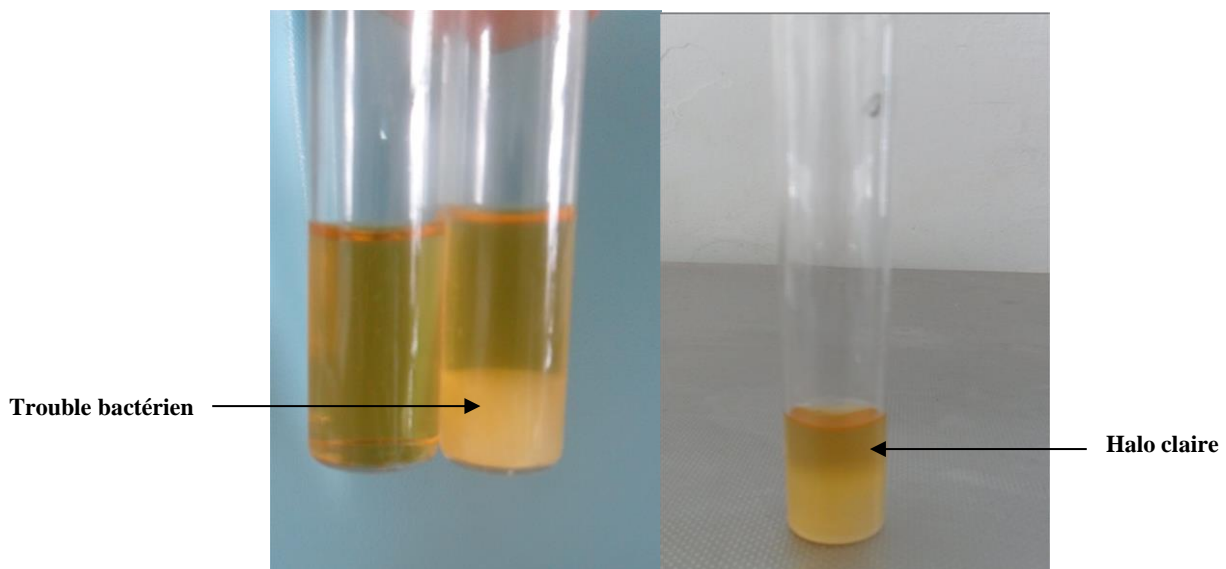
#### 1.1 Etude de l'aspect macroscopique des isolats

Après la purification des différents isolats sur milieu MRS gélosé, les colonies des BL étaient de petites tailles, de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre, transparentes et lisses, de formes lenticulaires et régulières (**figure 21**).

L'aspect macroscopique après purification des isolats de BL sur milieu MRS liquide, se traduit par l'apparition d'un halo clair sur la surface indiquant le caractère microaérophile de nos souches (**figure 22**).



**Figure 21:** Observation macroscopique des souches des BL purifiées sur milieu MRS gélosé



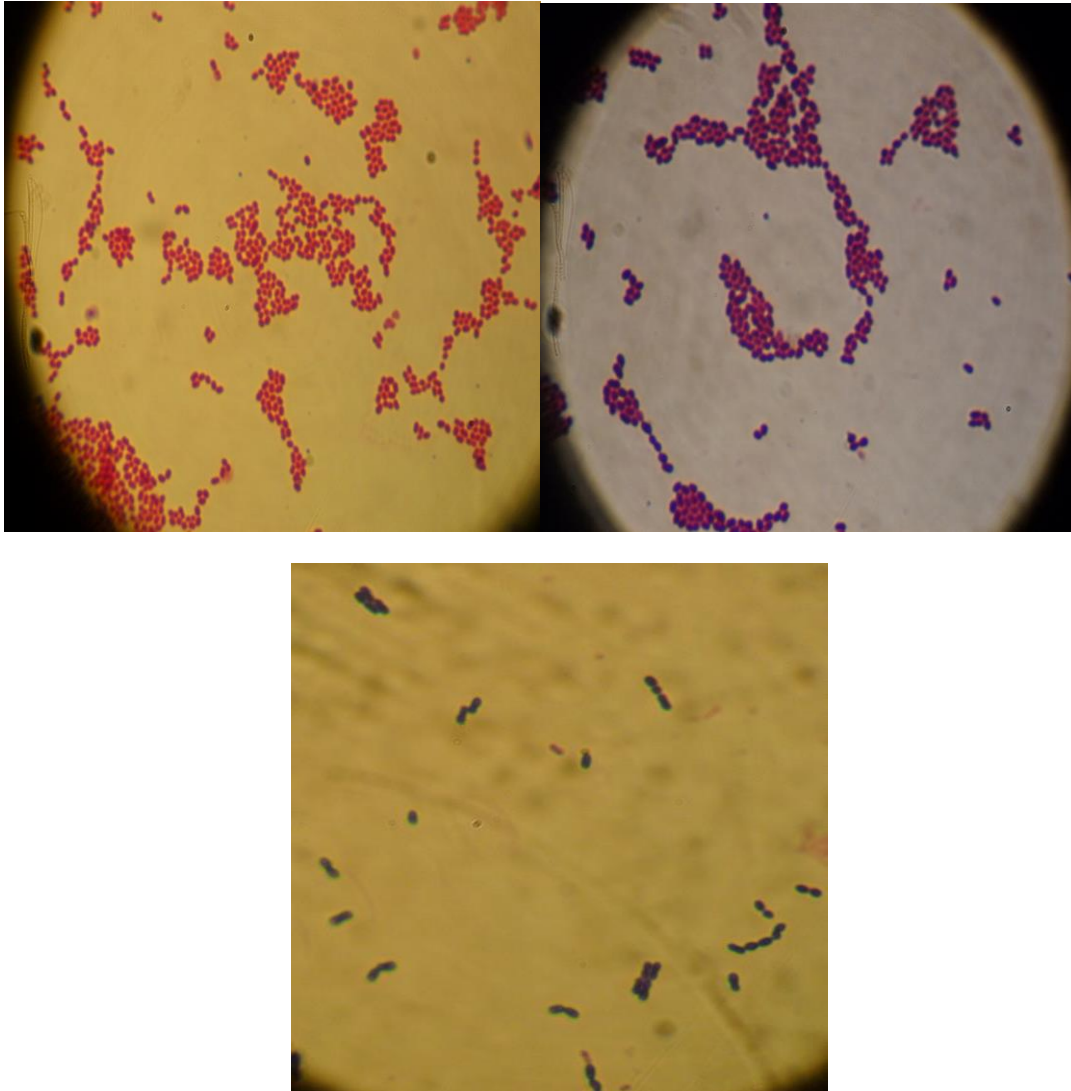
**Figure 22:** Observation macroscopique des souches des BL purifiées avec l'apparition d'un halo clair cultivées sur milieu MRS liquide

### 1.2 Etude de l'aspect microscopique des isolats

Afin de définir l'aspect ainsi que les caractères morphologiques et cellulaires des isolats des bactéries lactiques isolées du cru de chamelle, chèvre, et vache, une coloration de Gram a été d'abord effectuée pour différencier les bacilles des coques et d'éliminer ainsi tous les contaminants possibles comme les bactéries à Gram négatif et d'éventuelles levures.

La coloration de Gram a démontré que 123 isolats étaient des bactéries Gram positif, catalase-négatives, et non sporulantes. L'observation microscopique des souches a montré que les

cellules avaient une forme de coccobacilles ou cocci, disposées en petites chaînes ou en diplocoques (**figure 23**).



**Figure 23:** Coloration de Gram et Observation microscopique des BL au grossissement 100.

### 1.3 Croissance en présence de NaCl (4% et 6,5%) et pH (4,8 et 9,6)

La croissance des BL a été évaluée dans des milieux MRS contenant des différentes concentrations de chlorure de sodium NaCl, à différentes valeurs de pH. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches des BL isolées pouvaient croître à 4% de NaCl et un pH de 6,5 et non pas à 6,5% de NaCl et dans un pH de 9,6, les résultats sont montrés dans le **tableau 05**.

#### 1.4 La croissance à différentes températures

Les résultats obtenus dans ce test ont révélé que les 45 souches des bactéries lactiques ont pu croître à une température de 15°C, 37°C, et 45°C. Les résultats sont résumés dans le **tableau 05**.

#### 1.5 Recherche de l'Arginine Dihydrolase (ADH)

Les résultats obtenus ont révélé que les 54 souches des BL ont pu dégrader le lactose présent dans le milieu M16BCP et produire de l'acide lactique, provoquant ainsi une réduction de pH et un virement de couleur du violet au jaune au violet, ce qui signifie que les souches ont la capacité d'hydrolyser l'arginine (**tableau 05**).

#### 1.6 Hydrolyse de l'esculine

Les résultats obtenus dans ce test révèlent que 45 souches des bactéries lactiques sont esculine positive, car les résultats se traduisent par le noircissement du bouillon MRS modifié à 0,5 % d'esculine et 0,05 % de citrate ferrique ammoniacal. Les résultats sont présentés dans le **tableau 05**.

#### 1.7 Type fermentaire

Ce test clé nous a permis de différencier entre les souches homofermentaires et les souches hétérofermentaire tout en utilisant un milieu glucosé stérile qui contient une cloche de Durham. Aucun dégagement de gaz (CO<sub>2</sub>) n'a été observé à l'exception de *Weissella cibaria*. Les résultats sont montrés dans le **tableau 05**.

#### 1.8 Profil fermentaire des carbohydrates

La détermination du genre et des espèces bactériennes, réside essentiellement dans leur capacité à fermenter différents sucres en acide lactique et autres acides organiques. L'analyse des profils fermentaires révèle une grande diversité métabolique et carbohydrate chez les isolats retenus. Le **tableau 05** montre les résultats obtenus.

#### 1.9 La production de dextrane

Les résultats de test de la production dextrane à partir du saccharose sont mis en évidence en utilisant un milieu solide MSE qui estensemencé par striation puis incubé pendant 48h à 30°C, ont montré que toutes les souches ne produisaient pas des exopolysaccharides.

#### 1.10 L'utilisation de citrate

Les résultats de ce test ont montré que toutes les souches ont pu dégrader le citrate, les résultats sont présentés dans le **tableau 05**. Il est important de noter que la présence de cette enzyme est un caractère qui peut varier au sein d'une même espèce de BL (**Khedid et al., 2009**).

Les 45 souches de BL présumées ont été subdivisées en trois groupes (**tableau 05**) :

**-Groupe 1:** 19 souches homofermentaires, arginine dihydrolase (ADH) positive, acétoïne négative, citrate-positive, dextrane négative, croissance à 45°C, à pH 6,5 et 4% de NaCl, mais pas à pH 9,6 et 6,5% de NaCl. Ils ne fermentent pas le sorbitol et la mélibiose.

**-Groupe 2:** 18 souches homofermentaires, ADH positive, acétoïne positive, citrate positive, dextrane négative, peuvent croître à 45°C, pH 6,5 et 4% de NaCl, mais pas à pH 9,6 et 6,5% de NaCl. Ils ne fermentent pas l'arabinose, le sorbitol, le tréhalose et la raffinose.

**- Groupe 3:** 8 souches hétérofermentaires, ADH-positive, acétoïne-négative, citrate-positive, dextrane-négative, en croissance à 45°C, à pH 6,5 et 4% de NaCl, et pas à pH 9,6 et 6,5% de NaCl. Ils fermentent tous les sucres testés.

Tous les résultats des tests qui reposent sur la mise en évidence des caractères physiologiques et biochimiques, sont résumés dans le tableau 05. Après analyse de toutes ces données et suivant les recommandations de **Carr et al., 2002 et Khedid et al., 2009**, les trois groupes pourraient être attribués à l'espèce *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (**Groupe 1**), *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (**Groupe 2**) et *Weissella cibaria* (**Groupe 3**).

Toutefois, il faut souligner que cette identification n'est pas fiable à 100%, car il est important de réaliser d'autres tests, telle que l'utilisation de la galerie API 50 CHL ou d'autres méthodes plus précises qui nécessitent l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire pour confirmer cette identification.

**Tableau 05:** Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries lactiques isolées du lait cru de vache, de chèvre et de chameau algérien

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Nombre d'isolats	19	18	8
Coloration de Gram	G+	G+	G+
Formation de spores	-	-	-
Activité de la catalase	-	-	-
CO <sub>2</sub> à partir du glucose	-	-	+
NH <sub>3</sub> à partir de l'arginine	+	+	+
Croissance à température			
15°C	+	+	+
37°C	+	+	+
45°C	+	+	+
Croissance à pH			
6.5	+	+	+
9.6	-	-	-
Croissance en milieu avec NaCl			
4%	+	+	+
6.5%	-	-	-
Production			
Dextrane à partir de saccharose	-	-	-
Acétoïne à partir de glucose	-	+	-
Utilisation du citrate	+	+	+
Fermentation du sucre			
Arabinose	+	-	+
Ribose	+	+	+
Xylose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	+
Cellobiose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Melibiose	-	+	+
Saccharose	+	+	+
Trehalose	+	-	+
Raffinose	+	-	+
Esculine	+	+	+
Identification des espèces suivants clé d'identification par Carr <i>et al.</i> , 2002	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	<i>Weissellacibaria</i>

## 2 Identification moléculaire des souches bactériennes

Seize souches de BL qui ont montré une activité antagoniste contre l'espèce fongique phytopathogène *A. alternata* ont été caractérisées en outre par des analyses moléculaires. En particulier, la technique ITS-PCR a été appliquée pour détecter les différences inter et intra-espèces au niveau du genre ou de l'espèce (Pangallo *et al.*, 2009; Fhoula *et al.*, 2013). En détail, ITS-PCR a été appliquée pour analyser les souches BL16.19, BL14, BL14.2, BL4.10,

BL4.18 appartenant au groupe phénotypique 1, les souches BL2, BL4.6, BL31, BL4.19, BL4.13, BL4.25, BL16.16, BL14.16 appartenant au groupe phénotypique 2, ainsi que les souches BL35, BL10 et BL27 appartenant au groupe phénotypique 3.

Trois profils de PCR ont été obtenus après amplification de l'ITS puis séparation des produits de PCR par électrophorèse. Les modèles ITS-PCR ont montré de 1 à 3 bandes reproductibles allant de 600 pb à 900 pb (**figure 24**).



**Figure 24:** Profils ITS-PCR de 16 souches BL qui ont montré une activité antifongique. M = poids moléculaire (Marqueurs).

Selon le nombre de bandes obtenues et leurs poids moléculaires, les souches BL35, BL10, BL2, BL4.6, BL31, BL4.19, BL16.19, BL14, BL14.2, BL27, BL4.13, BL4.25, BL14.16 et BL4.10 regroupés dans le même profil avec trois bandes de 700 pb, 800 pb et 900 pb (groupe A) tandis que la souche BL4.18 et la souche BL16.16 regroupés en deux profils différents avec une bande de 700 pb (Groupe B) et deux bandes de 600 pb et 700 pb (Groupe C), respectivement. La bande de 700 pb était commune aux 16 souches (**tableau 06**).

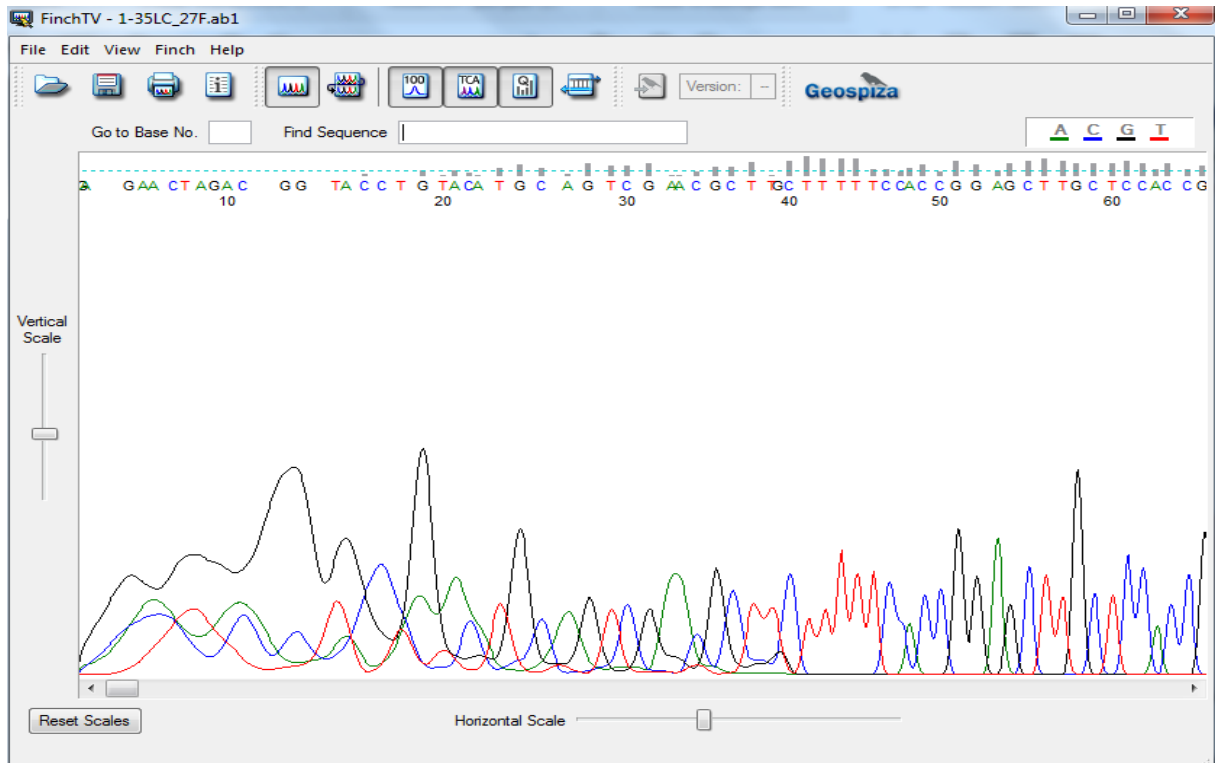
**Tableau 06:** Nombre de bandes obtenues après amplification de l'ADNr de l'ITS et leur poids moléculaire.

Souches	Nombre de bandes	Longueur du fragment [bp]	ITS-PCR Groupe
BL35; BL10; BL2; BL4.6; BL31; BL4.19; BL16.19; BL14; BL14.2; BL27; BL4.13; BL4.25; BL14.16; BL4.10	3	900 800 700	A
BL4.18	1	700	B
BL16.16	2	700 600	C

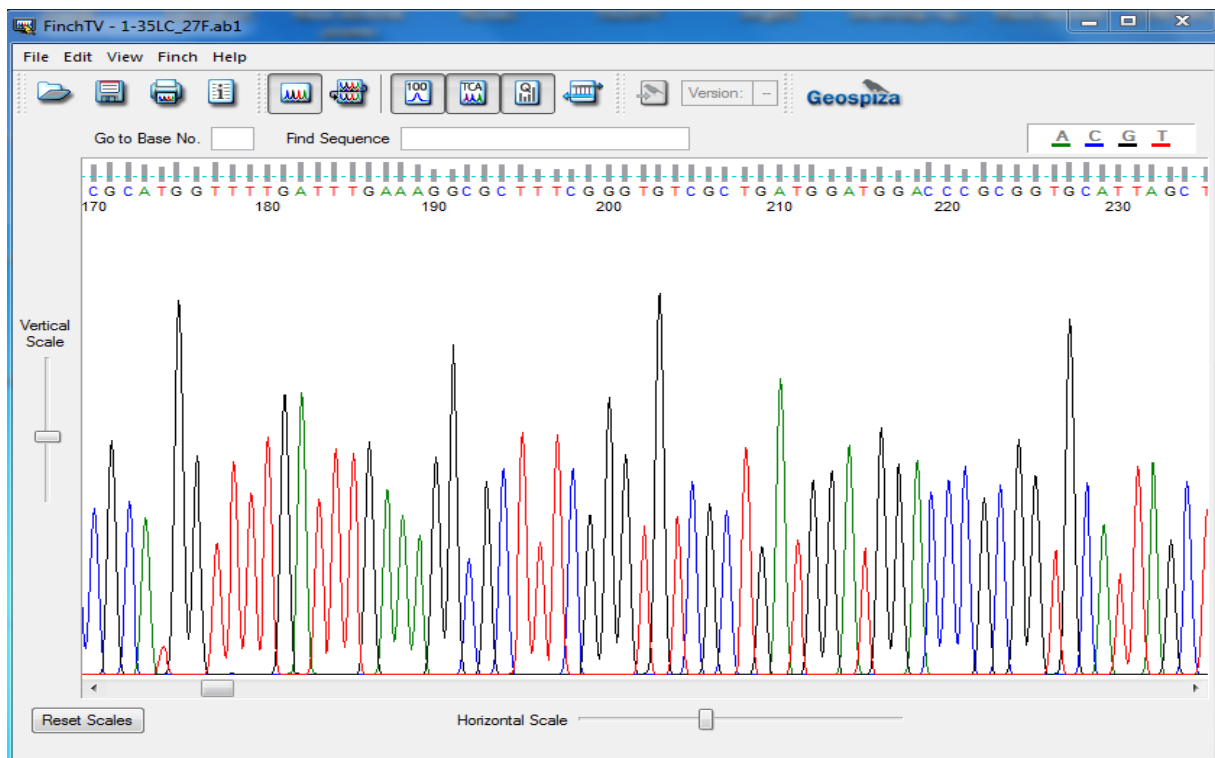
### 2.1 Traitement et analyse phylogénétique des séquences

Le séquençage des produits PCR a permis d'obtenir pour chacune des 16 souches, deux séquences brutes qui correspondent respectivement aux brins amplifiés par l'amorce **27F** (forward) et **1492R** (reverse). Les résultats des chromatogrammes des séquences obtenues ont été analysés avec le programme de bio-informatique FinchTV, qui nous a permis d'obtenir les informations nécessaires à partir du séquençage de chaque brin.

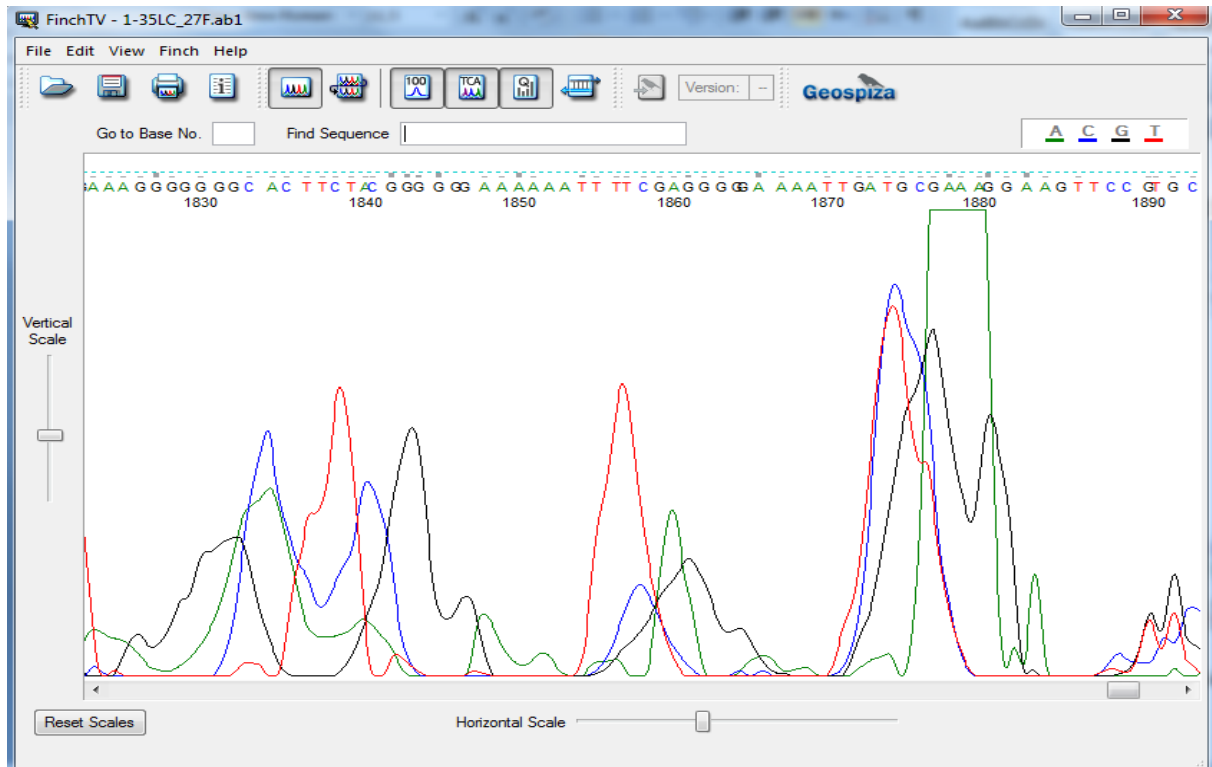
Avec l'affichage du chromatogramme avec le programme FinchTV, une révision manuelle des erreurs des séquences des deux brins a été réalisée, ces erreurs se produisent principalement du début à la fin de ce processus du séquençage. Les **figures 25, 26 et 27** montrent un exemple de traitement de la séquence des souches séquencées.



**Figures 25:** Extrait du chromatogramme du début de nucléotides présentant les mauvais pics de la séquence Forward de la souche BL35



**Figures 26:** Extrait du chromatogramme du centre de la séquence Forward de la souche BL35 (meilleurs piques)



**Figures 27:** Extrait du chromatogramme de la fin de la séquence Forward (présence de mauvais pics) de la souche BL35.

## 2.2 Analyse des séquences par le Blast et/ou FASTA33

Par suite, Les séquences traitées et nettoyées de chaque souche ont été comparées vis-à-vis d'autres séquences d'ADNr 16S de souches de référence mises da la base de données GenBank à NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) en utilisant le logiciel « BLAST et/ou FASTA33 », (**figure 28**). La majorité des souches ont affiché une similarité presque totale à l'exception d'une souche avec les séquences des espèces identifiées. Les résultats d'identité de chaque souche sont répertoriés dans le **tableau 07**.

## Results for job fasta-l20170223-134342-0531-3867150-oy (4.13)

Align.	DB:ID	Source	Length	Score (Bits)	Identities %	Positives %	E()
<input checked="" type="checkbox"/> 1	EM_PRO:HQ005362	<i>Enterococcus faecium</i> strain RLB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	748	584.1	99.7	99.7	2.8E-163
<input checked="" type="checkbox"/> 2	EM_PRO:JF728294	<i>Enterococcus faecium</i> strain GIMC502:BS-26P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	753	584.1	99.7	99.7	2.8E-163
<input checked="" type="checkbox"/> 9	EM_PRO:JF728293	<i>Enterococcus faecium</i> strain GIMC501:BS-75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	758	584.1	99.7	99.7	2.8E-163
<input checked="" type="checkbox"/> 12	EM_PRO:KT725820	<i>Enterococcus faecium</i> strain HR3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	775	584.1	99.7	99.7	2.9E-163
	EM_PRO:HQ005360	<i>Enterococcus faecium</i> strain VLP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	783	584.1	99.7	99.7	2.9E-163
<input checked="" type="checkbox"/> 14	EM_PRO:HG937719	<i>Enterococcus faecium</i> partial 16S rRNA gene, isolate R.M4 <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nucleotide sequences</li> <li>Samples &amp; ontologies</li> </ul>	784	584.1	99.7	99.7	2.9E-163

**Figure 28:** Exemple de résultats obtenu en utilisant le service FASTA33 sur le site des séquences des gènes ADNr 16S.

**Tableau 07:** Représentatifs des bactéries lactiques identifiées par séquençage partiel de l'ADNr 16S et leurs pourcentages de similarités

Souche de BL	Séquences relatives les plus proches	Similarité de séquence [%]
BL2	<i>Enterococcus lactis</i> MN560018.1	100
BL4.6	<i>Enterococcus lactis</i> MN560018.1	99.7
BL4.13	<i>Enterococcus lactis</i> MN560018.1	100
BL4.18	<i>Lactobacillus plantarum</i> MT573825.1	99.7
BL10	<i>Enterococcus lactis</i> MN560018.1	99.7
BL14	<i>Enterococcus faecium</i> MH236332.1	98.6
BL14.2	<i>Enterococcus faecium</i> MH236325.1	100
BL35	<i>Enterococcus faecium</i> MT573707.1	99.8
BL16.16	<i>Enterococcus sp.</i> JN173076	80.6

Les résultats obtenus de l'analyse par le FASTA33 ont indiqué que les isolats BL appartenant au groupe A peuvent être identifiés comme *Enterococcus faecium* (souches BL35, BL14 et BL14.2) avec une similitude de séquence de 98,6% à 100% et *Enterococcus lactis* (souches BL2, BL4.6, BL4.13 et BL10) avec similarité de séquence de 99,7% à 100%. La souche BL4.18 (groupe B) a été identifiée comme *Lactobacillus plantarum* avec une similarité de séquence de 99,7%, à l'exception de la souche BL16.16 appartenant au groupe C avait un très faible pourcentage de similitude (80,6%) a été identifiée.

### 2.3 Elaboration d'arbres phylogéniques

La construction de l'arbre phylogénétique a été réalisée en utilisant le programme MEGA 7.0, après avoir effectué un alignement complet des seize (16) souches de BL ainsi que les souches de référence. Par ailleurs, la méthode d'inférence phylogénétique (maximum de vraisemblance) et l'algorithme neighbor-joining ont été utilisés comme paramètres en établissant ainsi les relations phylogénétiques entre les différentes souches.

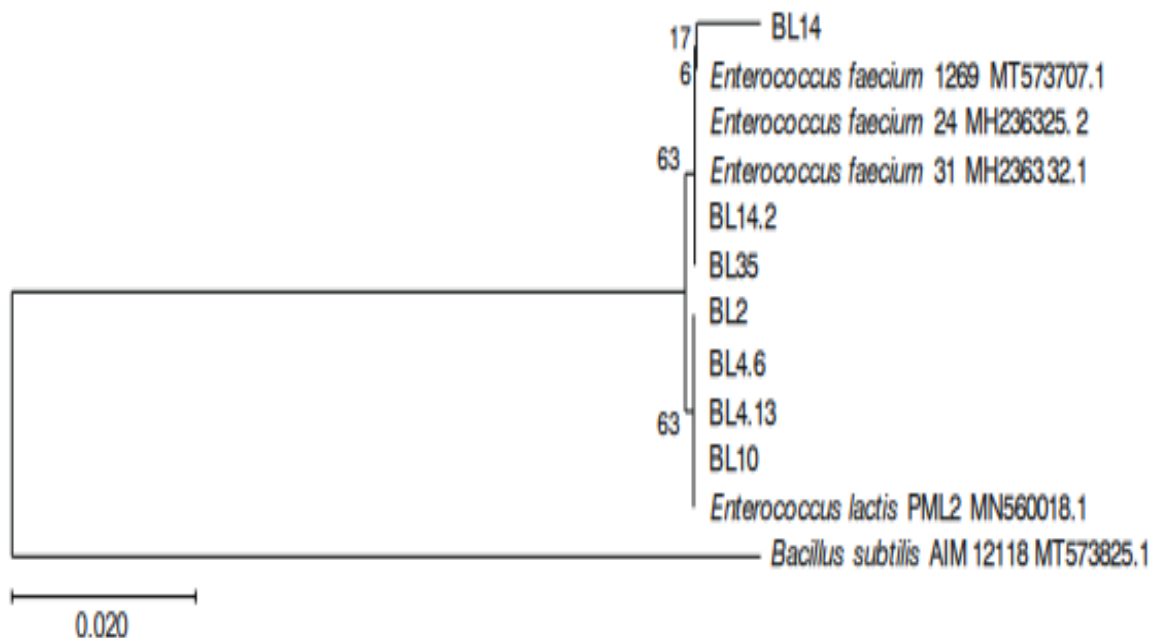
L'arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ADNr 16S des seize 16 souches de BL étudiées et des espèces de référence disponibles dans GenBank apparentées aux *Enterococcus sp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum*.

L'analyse phylogénétique basée sur l'ADNr 16S réalisée sur des souches appartenant au groupe

A comparée à quatre séquences d'ADN très proches extraites de GenBank conforte ces résultats, montrant l'existence de deux clusters très proches:

Un cluster regroupait les souches identifiées comme *E. faecium* (BL35, BL14 et BL14.2), tandis que l'autre regroupait les souches identifiées comme *E. lactis* (BL2, BL4.6, BL4.13 et BL10; **figure 29**). La souche BL4.18 (groupe B) a été identifiée comme *Lactobacillus plantarum* (similarité de séquence 99,7%).

La souche hétérofermentaire BL16.16 avait un autre profil ITS-PCR C et la comparaison avec les séquences génétiques de l'ADNr 16S dans la NCBI GenBank a abouti à un très faible pourcentage de similitude (80,6%), qui n'a pas permis l'identification au niveau de l'espèce. Pour cette raison, de nouvelles analyses sont en cours pour clarifier l'identification de cette souche.



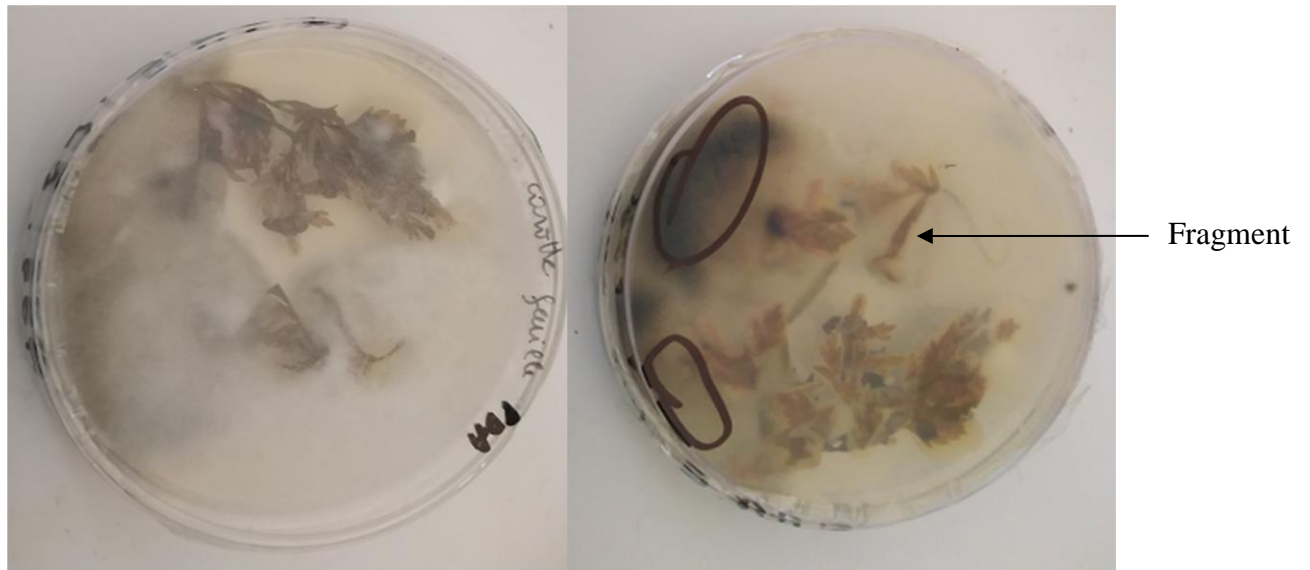
**Figure 29:** Arbre phylogéniques basé sur les séquences d'ADNr 16S des souches d'*Enterococcus faecium* et d'*Enterococcus lactis*, établi avec la méthode « Maximum likelihood » sur le logiciel MEGA7,0 (1000 simulations Bootstrap). Les chiffres près des branches montrent les pourcentages de bootstrap.

### 3 Isolement et identification d'*Alternaria alternata*

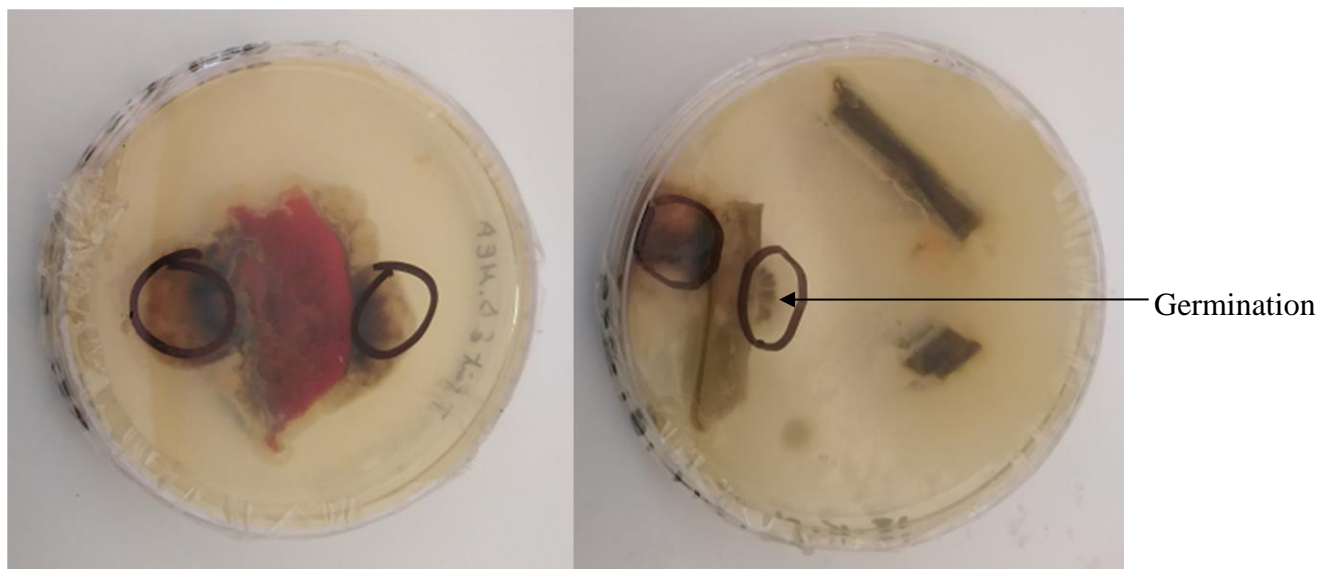
Vingt-sept isolats fongiques ont été recueillis sur des plantes présentant des symptômes similaires de brûlure foliaire. Ils ont affecté les feuilles, les tiges et les fruits.

#### 3.1 Isolement des microorganismes à partir des plantes de tomate et de carotte

Après 5 jours d'incubation, nous avons remarqué l'apparition de germinations mycéliennes de pigmentation blanchâtre, verdâtre, aux extrémités du matériel végétal, comme indiqué sur la Figure 30 et 31. Les isolats obtenus ont été purifiés par la culture monospore.



**Figure 30:** Isolement du champignon à partir de la plante de la carotte.



**Figure 31:** Isolement du champignon à partir de la plante de la tomate

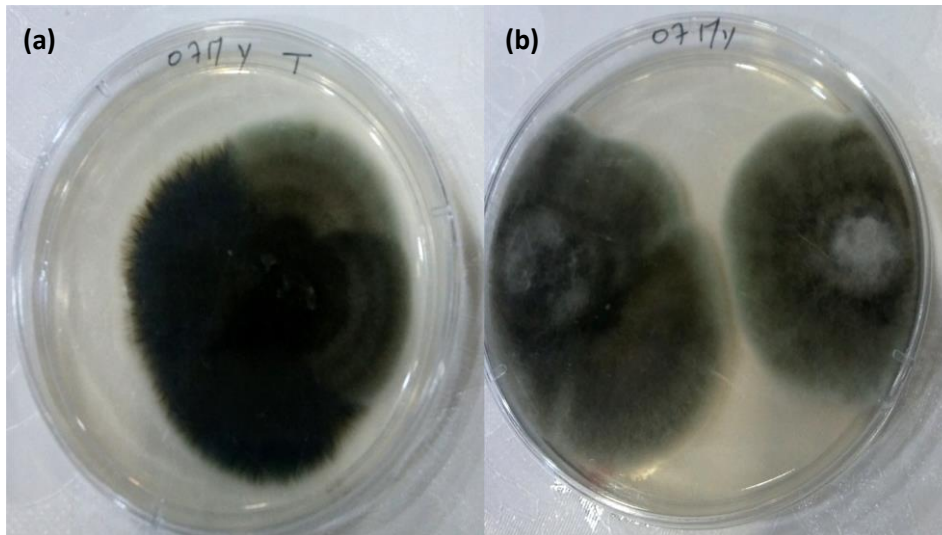
### 3.2 Identification des isolats

La purification des isolats a été réalisée par culture monospore, sous une lampe binoculaire ; elle nous a permis de faire une identification macro et microscopique.

#### 3.2.1 Caractères morphologiques

L'observation macroscopique sur le milieu PDA, nous a permis de sélectionner 05 souches appartenant au genre *Alternaria*, sur 27 purifiées

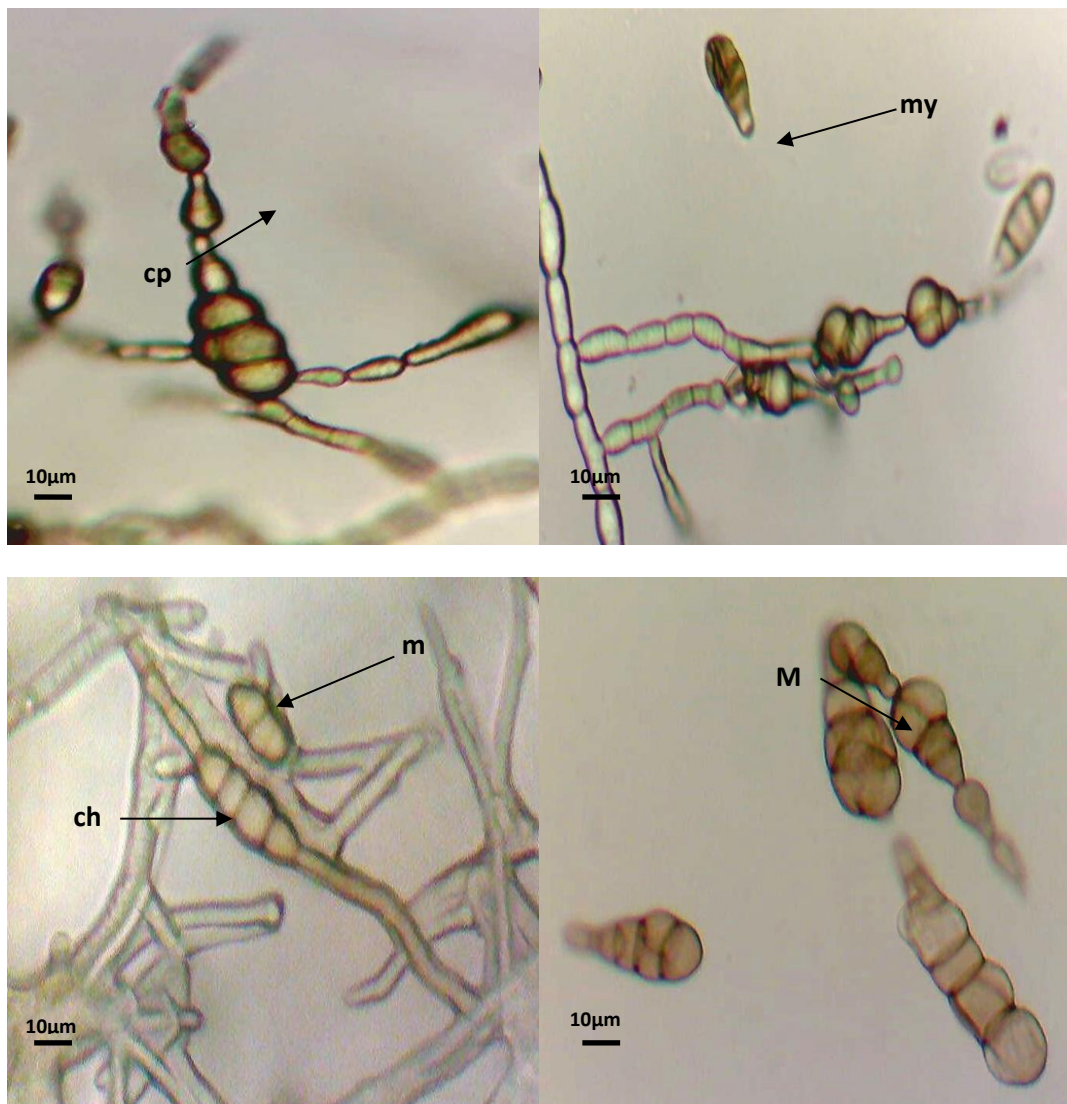
Cette identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence différents morphotypes pour les 05 souches. Les morphotypes obtenus sont : cotonneux, duveteux. Ces souches sont caractérisées par une pigmentation vert olive, sombre et noir (**figure 32**).



**Figure 32:** Observation macroscopique d'*Alternaria alternata* cultivé sur milieu PDA. (a) duveteux; (b) cotonneux

### 3.2.2 Identification microscopique

Sous microscope optique *Alternaria alternata* se présente sous la forme de longs filaments mycéliens cloisonnés (hyphes). Au milieu des filaments, des structures reproductrices brunes du champignon sont visibles : les conidies. Les conidies sont des spores asexuées qui assurent la reproduction asexuée du champignon. Au microscope optique à gros grossissement X400, les conidies sont parfois ovoïdes parfois elliptiques (**figure 34**). Elles portent souvent à leur extrémité un bec conique à cylindrique, brun et court. Ces spores asexuées sont pluricellulaires: elles sont divisées par des cloisons (ou septas) transversales et/ou longitudinal (on dit qu'elles sont obclavées). Les chaînes de conidies (simples ou ramifiées) sont produites à l'extrémité de bâtonnets marron appelés conidiophores. Les conidiophores sont simples, lisses, parfois ramifiées, courts ou allongés. Sur cette photo (**figure 33**) au microscope optique à gros grossissement (X400), on voit bien la forme elliptique des conidies et leur disposition en chaîne lorsqu'elles émergent du conidiophore. Les conidies peuvent ensuite se séparer et se disperser (**figure 33**).

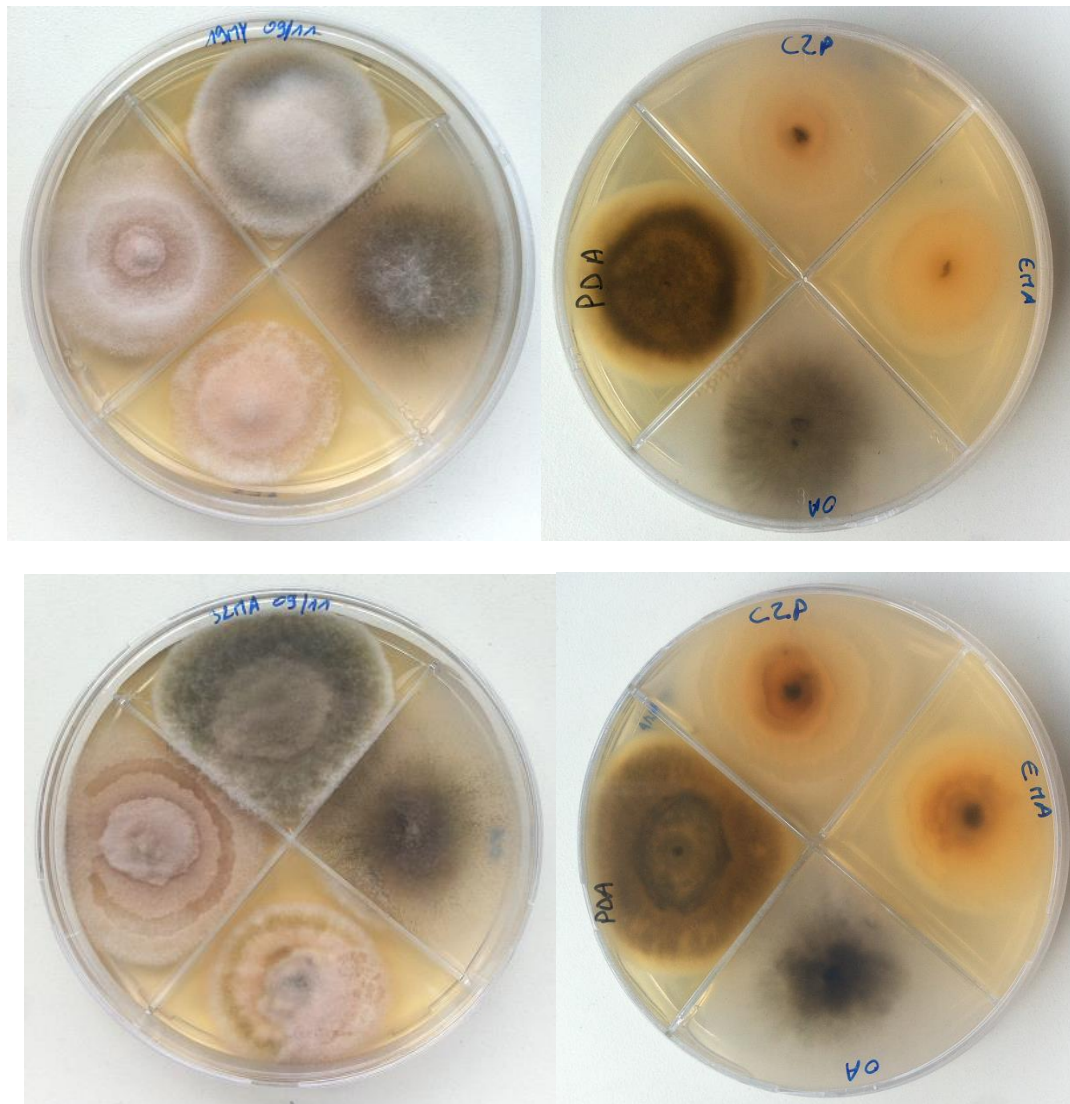


**Figure 33:** Observations microscopiques du mycélium cloisonné et des différentes conidies produites par les espèces d'*Alternaria alternata*, macroconidies et microconidies ; chlamydospores

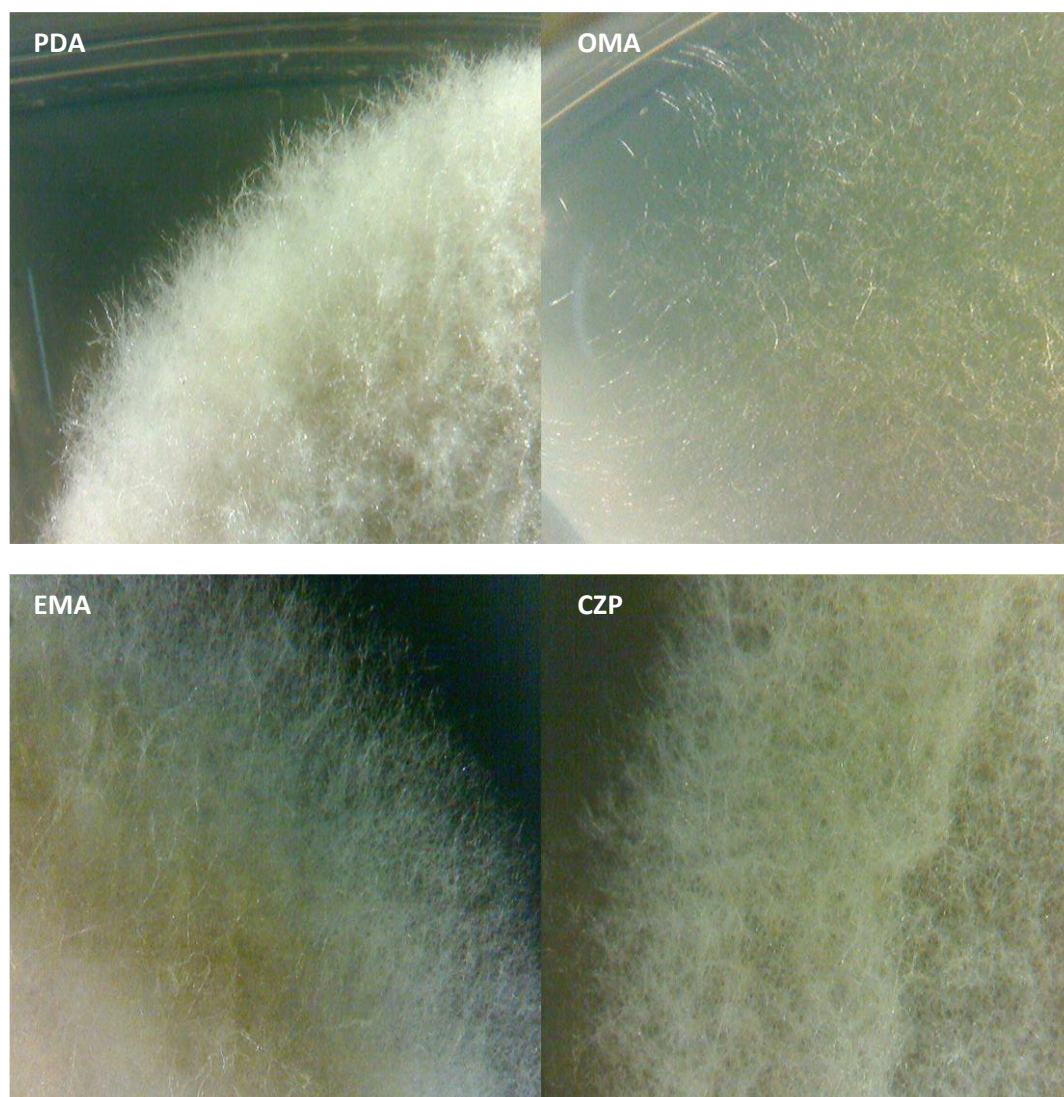
**M:** macroconidie ; **m:** microconidie ; **cp:** conidiophore ; **ch:** chlamydospore ; **my:** mycélium.

#### 4. Effet des différents milieux de culture

Toutes nos souches ont une meilleure croissance sur le milieu PDA et OMA (**annexe 1**) après 5 jours d'incubation avec un aspect du mycélium aérien cotonneux et une pigmentation naturelle verte olive foncée (**figure 34, 35**), (**tableau 08**). La pigmentation des colonies au verso est plus sombre.



**Figure 34:** Aspect de colonie d'*Alternaria alternata* sur les quatre différents milieux de culture PDA, OMA, CZP, EMA après 5 jours d'incubation



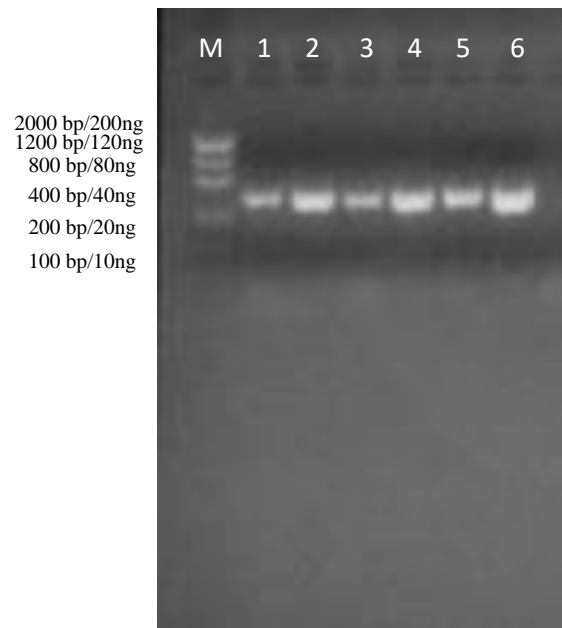
**Figure 35:** Observation microscopique (Microscope STEREO) d'*Alternaria alternata* 32MA sur quatre différents milieux de culture après 5 jours d'incubation au grossissement X8. **PDA:** aspect cotonneux; **OMA:** Aspect duveteux; **EMA:** Aspect Ras muqueux; **CZP:** Aspect rhizomorphique.

**Tableau 08:** Diamètre des colonies d'*Alternaria alternata* et la couleur dans les quatre différents milieux de culture

Milieu de culture Souches		PDA	EMA	CZP	OMA
19 MY	Ø (cm) mycélium	3.6/3.7	2.8/3.0	3.6/3.5	4.4/3.8
	Couleur mycélium	Blanc/Marom	Blanc/Beige	Blanc/Beige	Grie
37 MY	Ø (cm) mycélium	3.2/3.0	2.4/2.1	1.7/1.7	2.3/2.2
	Couleur mycélium	Vert foncé	Beige	Vert olive	Grie
17 MY	Ø (cm) mycélium	3.9/3.7	2.9/2.8	2.7/2.9	3.1/3.7
	Couleur mycélium	Vert foncé	Blanc/beige	Noir/Blanc	Grie
32 MA	Ø (cm) mycélium	4/4.4	3/3.3	4.5/3.7	4.3/4.4
	Couleur mycélium	Vert olive	Blanc/Beige	Blanc/Beige	Vert foncé
07 MY	Ø (cm) mycélium	4.5/3.9	3.3/3.2	4.3/4.0	5.0/4.0
	Couleur mycélium	Vert olive	Blanc/Beige	Blanc/Beige	Grie

### 5 Identification et caractérisation moléculaire d'*Alternaria alternata*

L'identification des isolats a été confirmée par analyse moléculaire en utilisant des amorces spécifiques. L'amplification et le séquençage de la région ITS de l'ADNr (**figure 36**), et la comparaison ultérieure dans la base de données EMBL-EBI ont confirmé l'identification phénotypique de 5 isolats fongiques (07MY, 17MM, 19MY, 32MA, 37MY) en tant qu'espèces *Alternaria alternata* (pourcentage de similitude  $\geq 99,4\%$ ).

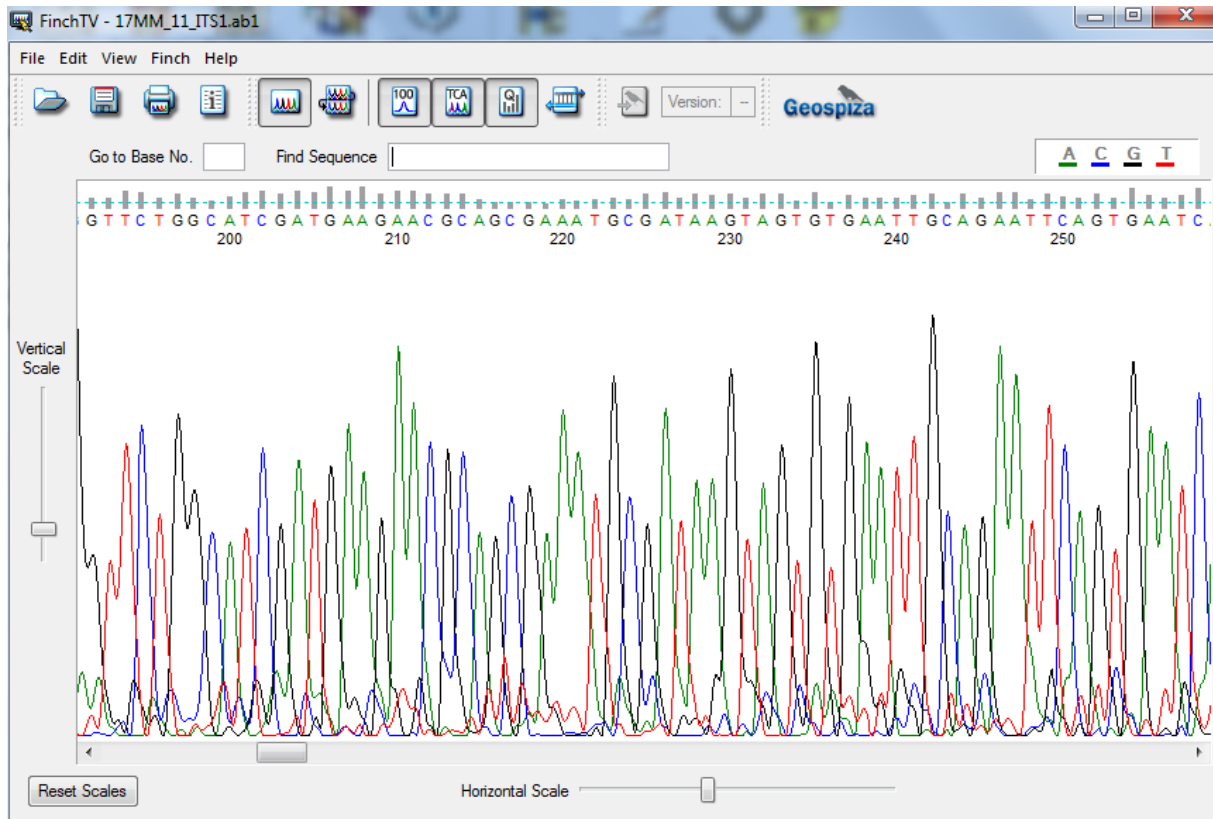


**Figure 36:** Gel d'amplification d'ADN ITS d'*Alternaria alternata* utilisant la paire d'amorces ITS1 / ITS4

### 5.1 Traitement et analyse phylogénétique des séquences

Le séquençage des produits PCR a permis d'obtenir pour chacune des 5 souches, deux séquences brutes qui correspondent respectivement aux brins amplifiés par la paire d'amorces ITS1 / ITS4. Les résultats des chromatogrammes des séquences obtenues ont été analysés avec le programme de bio-informatique FinchTV, qui nous a permis d'obtenir les informations nécessaires à partir du séquençage de chaque brin.

Avec l'affichage du chromatogramme avec le programme FinchTV, une révision manuelle des erreurs des séquences des deux brins a été réalisée, ces erreurs se produisent principalement du début à la fin de ce processus du séquençage. La **figure 37** montre un exemple de traitement de la séquence des souches séquencées.



**Figures 37:** Extrait du chromatogramme du centre de la séquence Forward de la souche *Alternaria alternata*17MM (meilleurs pics)

### 5.2 Analyse des séquences par Blast et/ou FASTA33

Par suite, Les séquences traitées et nettoyées de chaque souche ont été comparées vis-à-vis d'autres séquences d'ADNr de souches de référence mises dans la base de données GenBank à NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) en utilisant le logiciel « BLAST et/ou FASTA33 », (**figure 38**). La majorité des souches ont affiché une similarité totale  $\geq 99,4\%$ . Les séquences relatives les plus proches et le pourcentage de similarité de séquence de chaque isolat sont indiqués dans le **tableau 09**.

## Results for job fasta-I20170223-130534-0324-83319055-pg (17MM)

Align.	DB:ID	Source	Length	Score (Bits)	Identities %	Positives %	E()
<input checked="" type="checkbox"/> 1	EM_FUN: JQ84608 4	<i>Alternaria alternata</i> isolate 6472 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.  <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Samples &amp; ontologies</a></li> </ul>	500	458.7	100.0	100.0	2.9E-126
<input checked="" type="checkbox"/> 2	EM_FUN: FJ717682	<i>Alternaria alternata</i> isolate AltB internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.  <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Literature</a></li> <li>• <a href="#">Nucleotide sequences</a></li> <li>• <a href="#">Samples &amp; ontologies</a></li> </ul>	504	458.7	100.0	100.0	2.9E-126
<input checked="" type="checkbox"/> 3	EM_FUN: KP68615 4	<i>Alternaria alternata</i> strain YIMPH30329 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.  <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Samples &amp; ontologies</a></li> </ul>	504	458.7	100.0	100.0	2.9E-126
<input checked="" type="checkbox"/> 4	EM_FUN: KP27662 3	<i>Alternaria alternata</i> strain YIMPH30357 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.  <i>Cross-references and related information in:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Samples &amp; ontologies</a></li> </ul>	505	458.7	100.0	100.0	2.9E-126

**Figure 38:** Exemple de résultats obtenu en utilisant le service FASTA33 sur le site des séquences des gènes ADNr 5.8S.

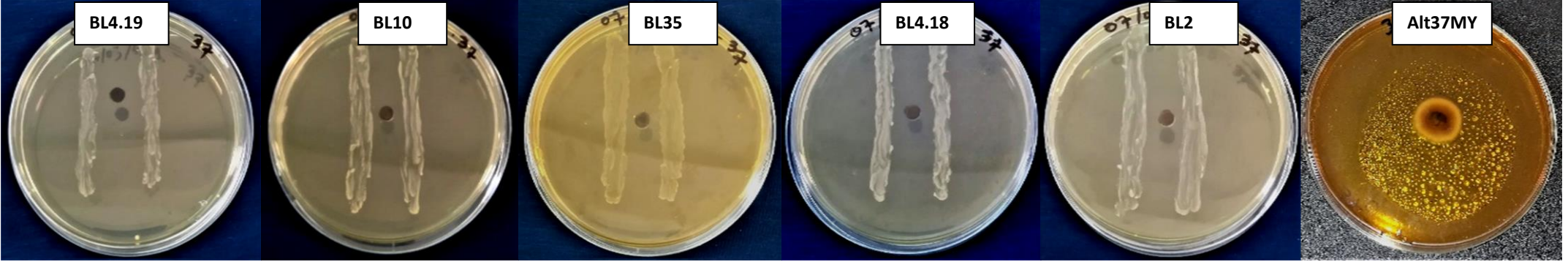
**Tableau 09:** Souches fongiques isolées et leur pourcentage de similarité

Souche fongique	Séquences relatives les plus proches	similarité de séquence [%]
<b>07MY</b>	<i>Alternariaalternata</i> MN822658	99.8%
<b>17MM</b>	<i>Alternaria alternata</i> MT573464	100%
<b>19MY</b>	<i>Alternaria alternata</i> KT356738	99.4%
<b>32MA</b>	<i>Alternariaalternata</i> MN481948	100%
<b>37MY</b>	<i>Alternaria alternata</i> MN093376	99.4%

## 6 La recherche de l'activité antifongique

### 6.1 Méthode de confrontation

Un total de 45 isolats bactériens, identifiés comme BL par des analyses biochimiques et physiologiques, ont été criblés pour l'activité antifongique contre 5 souches d'*A. Alternata*. L'activité antifongique des 45 isolats de BL a été d'abord recherchée en utilisant la méthode de confrontation contre les moisissures d'*Alternaria alternata*. Après incubation, les diamètres vertical et horizontal du mycélium inhibé par BL ont été mesurés **figure 40**. Le test a révélé une activité antifongique variable des souches bactériennes, avec des pourcentages d'inhibition de la croissance fongique entre 0% et 100%. Les résultats sont présentés dans **le tableau 10** et **la figure 39**. Cette étude a permis de sélectionner 16 souches de BL ayant une forte activité antifongique dont 4 *Enterococcus lactis*, 3 *Enterococcus faecium*, 8 *Enterococcus* sp, et 1 *Lactobacillus plantarum*, le tableau 10 résume tous les résultats obtenus. La **figure 39** montre quelques tests de criblages par la méthode de confrontation



BL4.19 vs Alt37MY

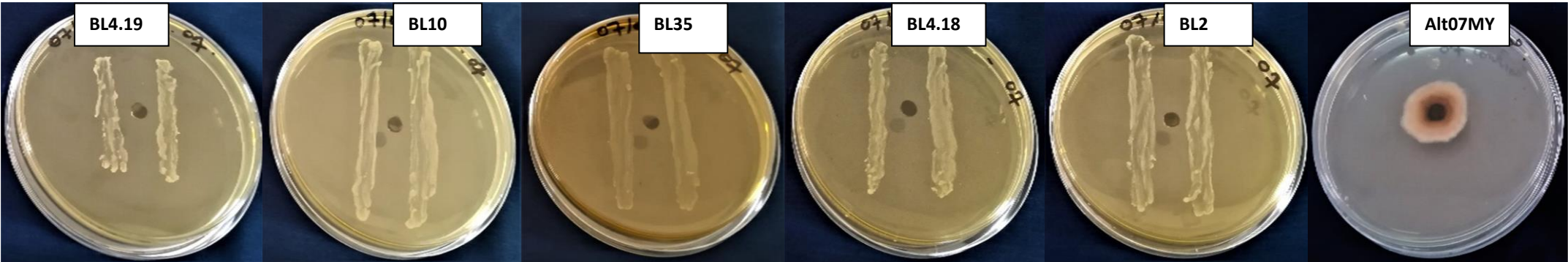
BL10 vs Alt37MY

BL35 vs Alt37MY

BL4.18 vs Alt37MY

BL2 vs Alt37MY

Control Alt37MY



BL4.19 vs Alt07

BL10 vs Alt07

BL35 vs Alt07

BL4.18 vs Alt07

BL2 vs Alt07

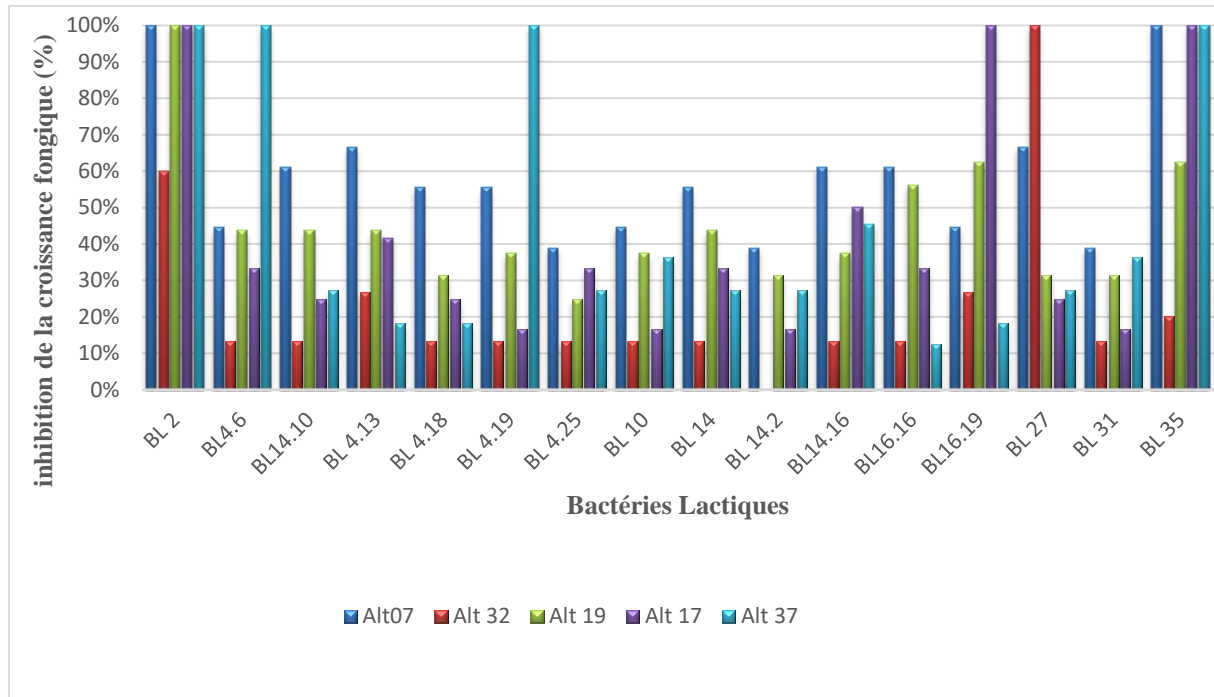
Control Alt07MY

Figure 39: Test de l'Activité antifongique des BL contre *Alternaria alternata* par la méthode de confrontation

**Tableau 10:** Activité antifongique de 16 souches de bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de vache, de chèvre et de chamelle contre cinq souches d'*A. Alternata*

Souches	Souche d' <i>Alternaria alternata</i>				
	Alt 07MY	Alt 32MA	Alt 19MY	Alt 17MM	Alt 37MY
<i>Enterococcus lactis</i> BL2	+++	++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus lactis</i> BL4.6	++	+	++	+	+++
<i>Enterococcus sp.</i> BL4.10	++	+	++	+	+
<i>Enterococcus lactis</i> BL4.13	++	+	++	++	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> BL4.18	++	+	+	+	+
<i>Enterococcus sp.</i> BL4.19	++	+	+	++	+++
<i>Enterococcus sp.</i> BL4.25	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus lactis</i> BL10	++	+	++	+	++
<i>Enterococcus faecium</i> BL14	++	+	++	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> BL14.2	+	-	+	+	+
<i>Enterococcus sp.</i> BL14.16	++	+	+	++	++
<i>Enterococcus sp.</i> BL16.16	++	+	++	++	++
<i>Enterococcus sp.</i> BL16.19	++	+	++	+++	+
<i>Enterococcus sp.</i> BL27	++	+++	+	+	+
<i>Enterococcus sp.</i> BL31	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> BL35	+++	+	++	+++	+++

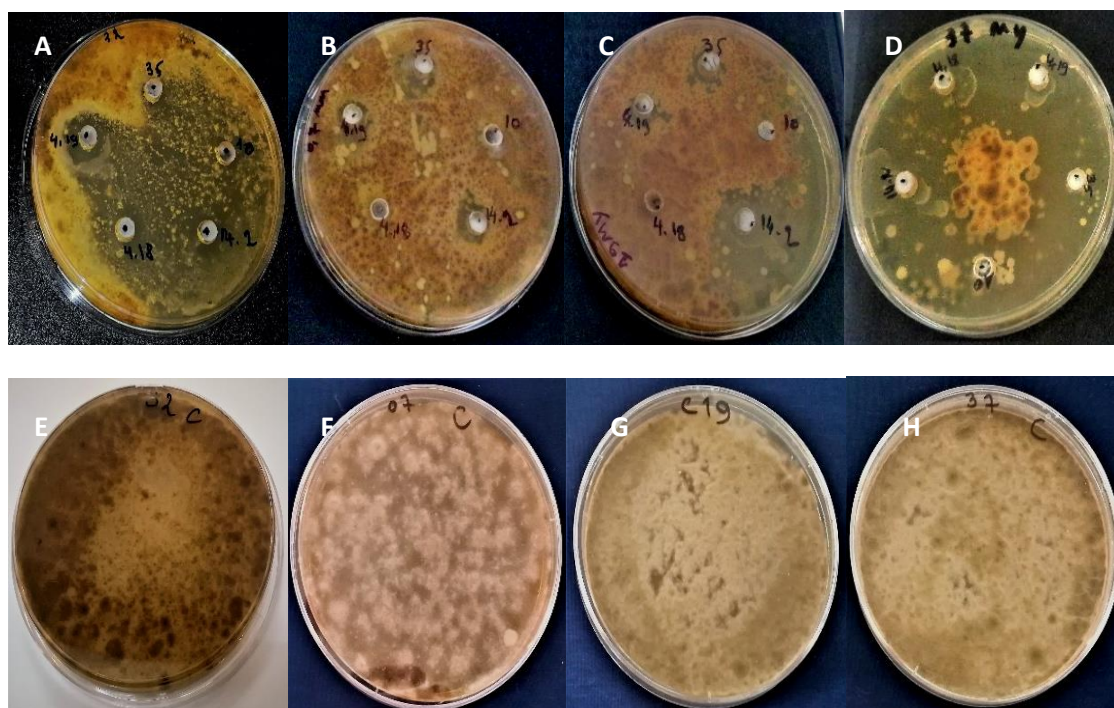
BL - bactéries lactiques. (-) - pas d'inhibition visible, (+) - faible activité antifongique avec un taux d'inhibition entre 13,3% et 38,9%, (++) - activité antifongique intermédiaire avec un taux d'inhibition entre 40% et 70%, (+++) - forte activité antifongique avec un taux d'inhibition  $\geq$  70%.



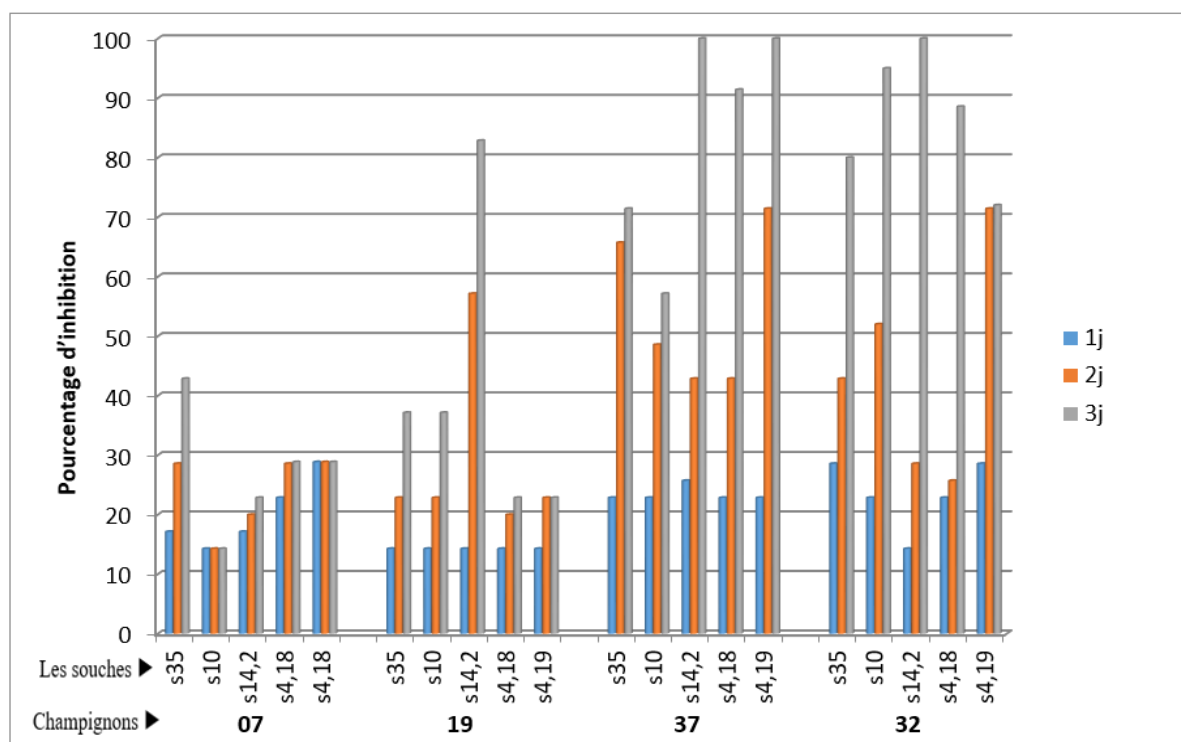
**Figure 40:** Inhibition de cinq souches phytopathogènes d'*Alternaria alternata* par 16 souches de bactéries lactiques.

## 6.2 Méthode des puits

Le test de l'activité anti fongique par la méthode des puits a été réalisé après la sélection des souches des bactéries lactiques qui ont une forte activité antifongique vis-à-vis des champignons phytopathogènes suite aux résultats obtenus de la confrontation. Après incubation, les diamètres vertical et horizontal du mycélium inhibé par les BL ont été mesurés figure 41. Le test a révélé une activité antifongique variable des souches bactériennes, avec des taux d'inhibition de la croissance fongique entre 13.33% et 100%. Les résultats sont présentés dans la **figure 42**.



**Figure 41:** Activité antifongique de 5 souches de BL contre *Alternaria alternata* par la méthode des puits  
**A:** Alt32MA, **B:** Alt07MY, **C:** Alt19MY, **D:** Alt37MY. **E, F, G, H:** Contrôles.



**Figure 42:** Inhibition de quatre souches phytopathogènes *d'Alternaria alternata* par les métabolites de cinq souches de bactéries lactiques.

## 7 Caractérisation des métabolites antifongiques

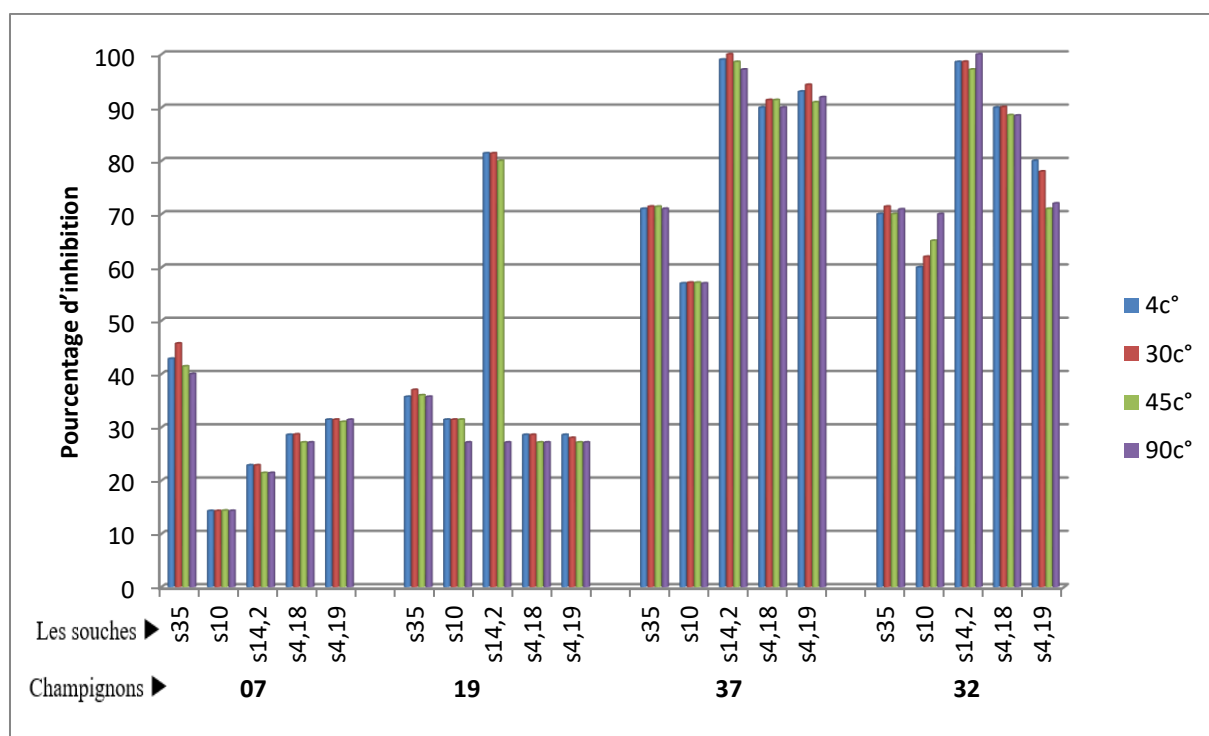
### 7.1 L'effet de la température

L'effet du traitement thermique a été examiné en traitant le surnageant pendant 30 minutes aux différentes températures: 4°C, 30°C, 45°C, 90°C. Avant d'être examiné pour leur activité antifongique.

L'effet de températures sur l'activité de surnageant a été déterminée par diffusion en puits vis-à-vis des champignons phytopathogènes.

On constate que cette substance reste stable pendant 30 min de 4°C jusqu'à 90°C, Le composé inhibiteur produit par les isolats lactiques a été considéré comme thermostable.

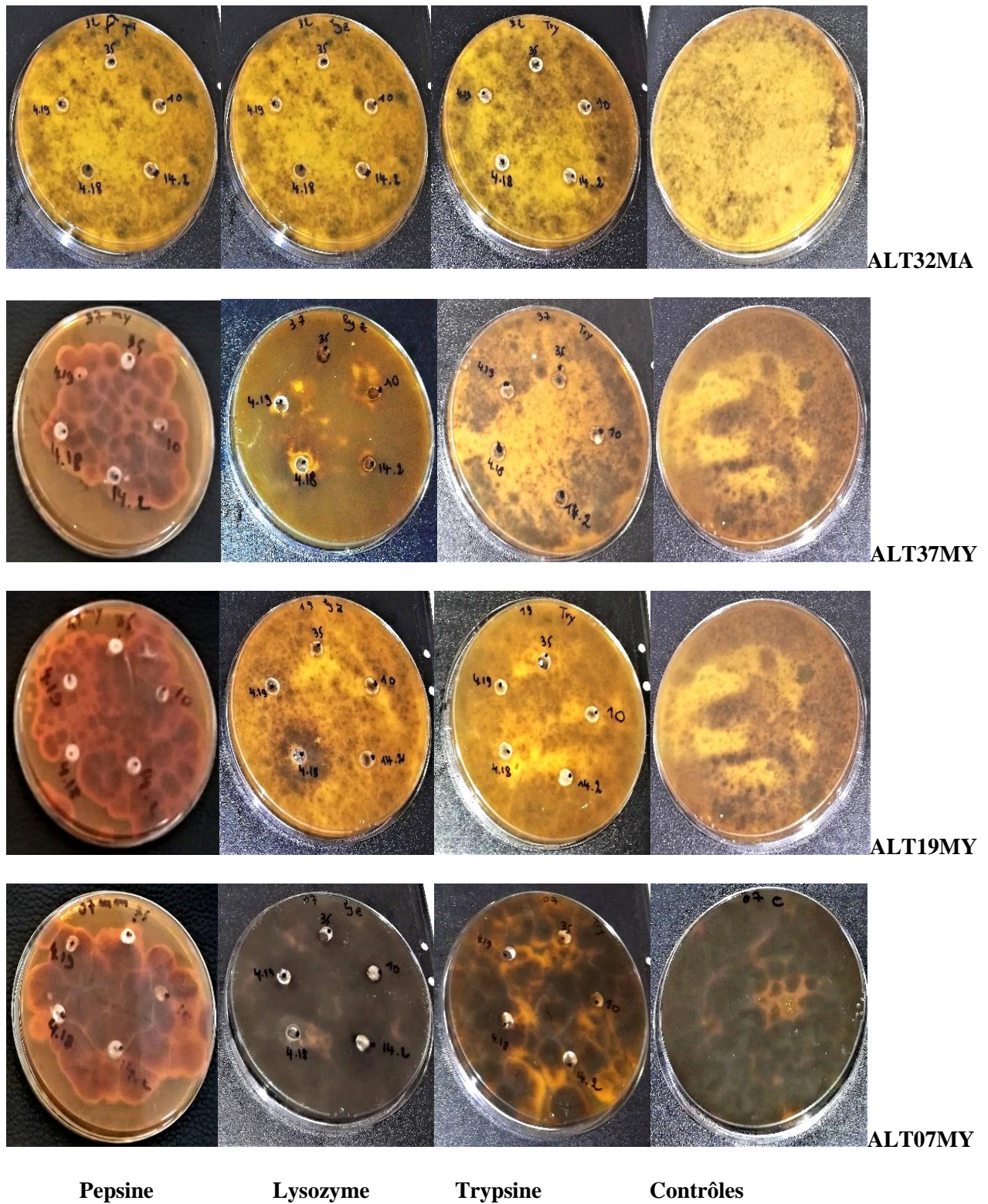
La **figure 43** illustre Les résultats après le traitement thermique des surnageant et leur effet antifongique.



**Figure 43:** Evaluation de l'effet de la température sur les substances antifongiques.

### 7.2 L'effet des enzymes protéolytiques

Le traitement des substances antifongique a été soumis à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, lysozyme) (**figure 44**). Ces dernières altèrent complètement l'activité antifongique, Cela indique que la partie biologiquement active de l'inhibiteur est essentiellement une protéine. Cette propriété indique que la substance inhibitrice est considérée comme une bactériocine.



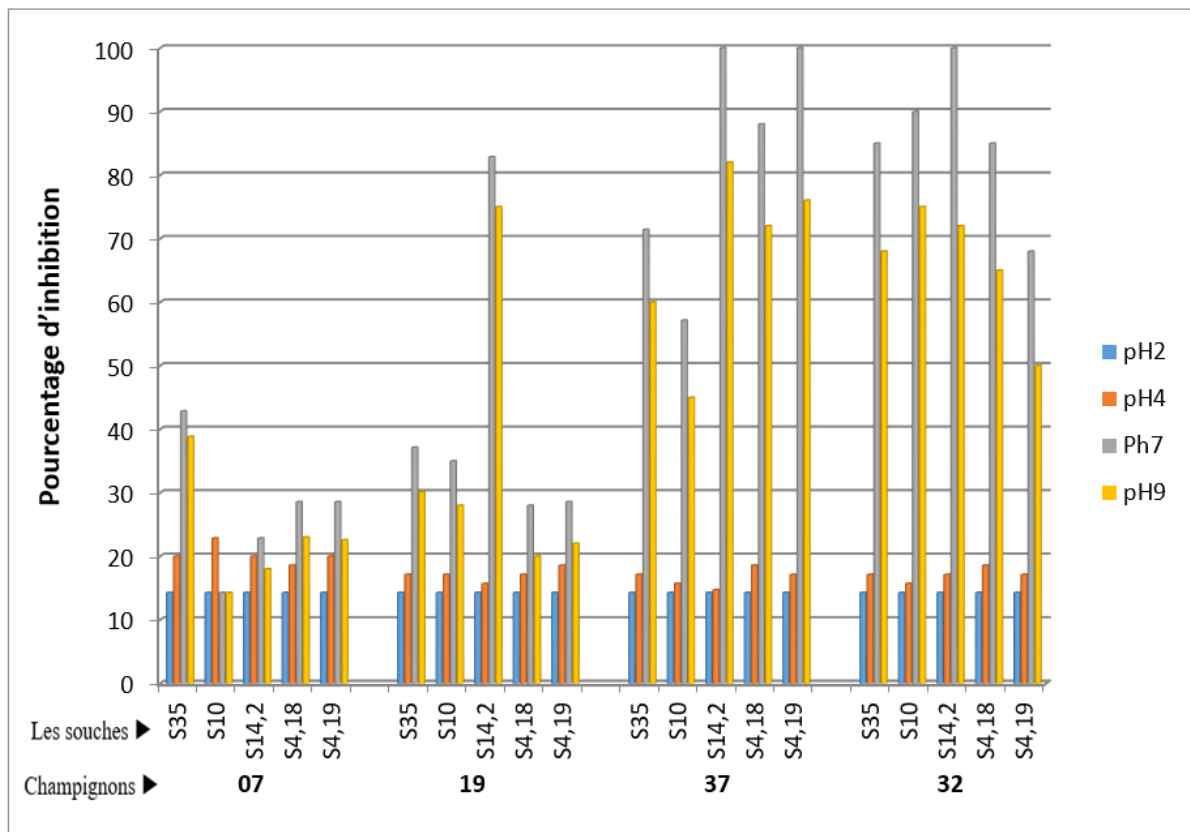
**Figure 44:** Effet des enzymes protéolytique sur les substances antifongiques.

### 7.3 L'effet du pH

Un autre paramètre tout autant important pour la production de bactériocines, il s'agit du pH du milieu de culture (**Blom *et al.*, 1997**). Une inhibition, qui semblerait bien meilleure à pH neutre (pH = 7), nous avons tenté d'utiliser le milieu MRS tamponnée à pH = 7 (**Benmouna *et al.*, 2008**).

L'effet inhibiteur a été testé comme pour le reste des paramètres étudiés précédemment, c'est-à-dire par antagonisme différé du surnageant des isolats lactiques (**Sabia *et al.*, 2014**).

Une inhibition totale a été observée à pH 7 pour toutes les souches et une diminution de l'inhibition dans des valeurs de pH 2, 4 (**figure 45**), ceux-ci suggèrent la contribution des bactériocines dans l'activité antifongique parce que leur activité dépend du pH neutre.



**Figure 45:** L'effet du pH de milieu sur les substances antifongiques

## Discussion générale

Le genre *Alternaria* comprend des espèces phytopathogènes susceptibles d'affecter les cultures au champ ou de provoquer la récolte et la décomposition après récolte des produits végétaux. Le développement de nouveaux outils taxonomiques a montré que *Alternaria alternata* est prédominante dans plusieurs cultures, y compris les fruits et légumes, entraînant des pertes substantielles de rendement (**Lee et al., 2015**). En outre, *A. alternata* est capable de produire plusieurs mycotoxines dans les plantes et/ou les fruits infectés, qui peuvent sérieusement compromettre la qualité des produits transformés et présentent également un risque pour la sécurité alimentaire (**Santos et al., 2016**).

Récemment, les bactéries lactiques (BL) ont suscité un grand intérêt dans le domaine de la conservation des aliments, en raison de leur capacité à produire une pléthore de métabolites antifongiques et à éliminer les mycotoxines des denrées alimentaires et des aliments pour animaux (**Sadiq et al., 2019**). Les bactéries lactiques (BL) sont des bâtonnets Gram-positifs, non sporulants, tolérants à l'air et à l'acide, organotrophes, fermentatifs ou cocci produisant de l'acide lactique, le principal produit final métabolique de la fermentation des glucides (**Perczak et al., 2018**).

Ils ont une distribution ubiquitaire, présents dans les produits laitiers (fermentés), la viande, les légumes, le sol, l'eau ainsi que dans les voies gastro-intestinale et urogénitale des humains et des animaux (**Liu et al., 2014**). À ce jour, les études sur l'activité antifongique des bactéries lactiques contre le champignon phytopathogène *Alternaria alternata* sont limitées (**Lipinska et al., 2016; Gajbhiye et al., 2017; Bartkiene et al., 2019**).

Le lait cru de chamelle, de chèvre, et de vache déjà utilisés auparavant dans diverses études, ont montré que ces aliments étaient un écosystème riche en bactéries lactiques (**Badis et al., 2005; Kersani, 2018**).

Dans la présente étude, 123 souches bactériennes isolées de lait cru de vache, de chamelle et de chèvre de trois régions d'Algérie, dont 45 ont été identifiées comme des bactéries lactiques.

Les différents isolats ont été identifiés en premier lieu phénotypiquement en se basant sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques. Ensuite, par une méthode génotypique.

Les principaux groupes de bactéries lactiques isolées dans cette étude au laboratoire sont phénotypiquement similaires aux *Lactococcus* sp, le même résultat a été mentionné par **Merzouk et al. (2013)**.

L'étude microscopique réalisée après coloration de Gram a révélé des cellules Gram positif de forme cocci et ovoïdes en chainettes courtes ou en paires, permettant ainsi d'écartier le genre *Lactococcus* et *Weissella* qui se regroupe généralement en tétrade. Cette pré-identification a été réalisée en se basant sur plusieurs études (**Zarour, 2010; Holzapfel et Wood, 2014**). Il est par ailleurs important de rappeler que ces caractères morphologiques ne sont pas des critères d'identification complètement sûr.

La caractérisation biochimique et physiologique des 45 souches bactériennes en se basant sur les manuels d'identifications décrits par **Carr et al., (2002); Khedid et al., (2009) Holzapfel et Wood, (2014)** nous a permis de les regrouper en trois groupes : deux groupes homofermentaires identifiés comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* et un groupe hétérofermentaire nommé *Weissella cibaria*.

Les cocci lenticulaires du groupe 3, souches hétérofermentaires, produisant du CO<sub>2</sub> à partir de glucose et du dextrane dans le milieu MSE ADH-positives, acétoïne-négatives, citrate-positives, dextrane-négatives, croissance à 45°C, à pH 6,5 et avec 4% de NaCl, et non pas à pH 9,6 et 6,5% de NaCl. Ils fermentent tous les sucres testés étaient identifiés au genre *Weissella*, présentaient 17.78% (**Devoyod et Poullain, 1988**).

Les coques circulaires homofermentaires, incapables de produire du CO<sub>2</sub> à partir de glucose et d'utiliser l'arginine, acétoïne négative ou de croître à 45°C, en présence de 4% de NaCl et un pH de 6,5 et non pas à 6,5% de NaCl et dans un pH de 9,6 se rapprochaient des genres *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, représentant le groupe 1 avec 42.22%, tandis que, le deuxième groupe qui représente 40% des BL homofermentaires, ADH positives, acétoïne positives, citrate positives, dextrane négatives, les souches peuvent croître à 45°C, pH 6,5 et avec 4% de NaCl, mais pas à pH 9,6 et 6,5% de NaCl. Ils ne fermentent pas l'arabinose, le sorbitol, le tréhalose et la raffinose se rapprochaient de *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Malgré le taux faible des microorganismes obtenus dans cette étude, les résultats de l'identification phénotypique des isolats retenus ont montré une biodiversité dans les échantillons de lait (chamelle, chèvre, et vache), analysés.

Par ailleurs, d'autres méthodes plus précises utilisant la biologie moléculaire ont été nécessaires afin de valider ces résultats. Il est important de mentionner que l'identification phénotypique

n'est pas totalement sûre à cause de certains caractères variables, comme par exemple les fermentations des sucres qui affichent des inconvénients car elles peuvent être ambiguës. De plus, leur reproductibilité entre laboratoires est parfois mauvaise, pouvant ainsi mener à une identification erronée (**Drosinos et al., 2007**).

Tous les isolats de BL ont été testés pour leur activité antifongique potentielle contre 5 souches alternatives d'*Alternaria* isolées à partir de tiges et de fruits infectés de tomate et de carotte avec des taches similaires à celles causées par *Alternaria alternata*.

Parmi elles, seize souches appartenant aux trois groupes biochimiques ont montré une activité antagoniste contre l'espèce fongique phytopathogène *A. alternata* et elles ont été davantage caractérisées par des analyses moléculaires : en particulier, les analyses d'espaces transcrits internes (ITS-PCR) appliquées pour détecter des différences inter et intra-spécifiques au niveau du genre/espèce (**Pangallo et al., 2009; Fhoula et al., 2013**).

Les résultats ont démontré que les souches homofermentaires attribuées par des analyses biochimiques et physiologiques à *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* a généré le même profil ITS (profil ITS-PCR A) à l'exception de la souche BL4.18 (profil ITS-PCR B). La méthode de la biologie moléculaire n'a pas confirmé notre identification phénotypique en quelque sorte, les isolats étaient *Enterococcus* sp, *Enterococcus lactis*, et *Enterococcus faecium*, à l'exception d'une souche qui s'est avérée être *Lactobacillus plantarum*. Cela peut s'expliquer par le fait que les lactocoques et les entérocoques et les lactobacilles ont les mêmes caractéristiques biochimiques et phénotypiques, ce qui a été confirmé par **Schleifer et Ludwig 1995, Carr et al., 2002**.

L'ARN 16S est composé d'environ 1550 paires de bases et l'avantage avec ce dernier, est qu'il comporte de régions identiques présentes chez toutes les bactéries et d'autres régions plus variables et spécifiques à une espèce, une sorte de signature. Il est donc possible grâce à un séquençage de ce gène et une comparaison avec d'autres séquences, non seulement d'identifier les espèces mais également d'étudier les relations phylogénétiques, connaître les espèces proches ou éloignées et voir le niveau évolutif en retraçant la filiation des microorganismes (**Rajendhran et Gunasekaran, 2011**).

Les souches représentatives de chaque profil ITS-PCR ont été identifiées par analyse de la séquence du gène de l'ADNr 16S et comparées aux séquences connues dans les bases de données GenBank et EBI-EMBL. Les résultats sont affichés dans **tableau 07**.

Les isolats LAB appartenant au groupe A ont été identifiés comme *Enterococcus faecium* (souches BL35, BL14 et BL14.2) avec une similitude de séquence de 98,6% à 100%, et *Enterococcus lactis* (souches BL2, BL4.6, BL4.13 et BL10) avec séquence similitude de 99,7% à 100% (**tableau 7**).

L'analyse phylogénétique a été une étape essentielle qui a complété et validé l'identification génotypique, les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel MEGA 7.0

L'analyse phylogénétique basée sur l'ADNr 16S réalisée sur des souches de profil ITS-PCR a montré l'existence de deux clusters très proches l'un de l'autre : un cluster regroupait les souches identifiées comme *Enterococcus faecium* (BL35, BL14 et BL14.2), tandis que l'autre cluster regroupait les souches identifiées comme *Enterococcus lactis* (BL2, BL4.6, BL4.13 et BL10) (**figure 29**).

La souche hétérofermentaire BL16.16 avait un autre profil ITS-PCR (C) et la comparaison avec les séquences génétiques de l'ADNr 16S dans la NCBI GenBank a abouti à un très faible pourcentage de similitude (80,6%), qui n'a pas permis une identification au niveau de l'espèce; pour cette raison, des analyses complémentaires sont en cours pour clarifier l'identification de cette souche.

Les différents patrons de genres obtenus pour l'identification des BL par des analyses biochimiques et physiologiques et par séquençage de l'ADNr 16S ont déjà été mis en évidence par d'autres auteurs (**Ruiz Rodríguez et al., 2019**). En fait, le choix des méthodes d'identification appropriées pour les BL est controversé. En général, à quelques exceptions près, un test phénotypique pourrait convenir pour l'identification clinique des isolats, tandis que pour les analyses moléculaires des isolats alimentaires, il est considéré comme l'approche la plus sensible et la plus fiable (**Ruiz Rodríguez et al., 2019**).

Sur la base du séquençage de l'ADNr 16S, la plupart des souches isolées dans cette étude appartenaient au genre *Enterococcus* avec les trois espèces *Enterococcus* sp, *E. faecium* et *E. lactis*.

La présence du genre *Enterococcus* dans le lait cru de chamelle, de chèvre et de vache a déjà été soulignée par des études antérieures (**Zamfir et al., 2006; Tormo et al., 2015; Rahmeh et al., 2019**) ainsi que pour *Lactobacillus plantarum* de **Fowoyo et al., 2015**. La prédominance d'*Enterococcus* ou de *Lactobacillus plantarum* semble être due en partie à certaines

caractéristiques de l'exploitation. Les espèces appartenant au genre *Enterococcus* représentent une grande partie de la flore autochtone du tractus gastro-intestinal des mammifères (**Giraffa, 2003**) et elles peuvent contaminer le lait cru par contamination intestinale ou environnementale : par exemple, les pratiques agricoles comme le contact direct entre la salle de traite favorisent l'inoculation du lait par *Enterococcus faecium* (**Tormo et al., 2015**). **Gelsomino et al., 2001** ont montré que les entérocoques étaient présents dans les excréments des bovins, les matières fécales humaines et le lait. **Detomi 2009** a montré que les entérocoques étaient des bactéries lactiques prédominantes dans la litière caprine (50 des 51 souches étaient des entérocoques) et confirmé par **Hélène et al., 2015**.

Après contamination, les espèces d'*Enterococcus* deviennent une partie importante de la microflore alimentaire fermentée en raison de leur capacité à survivre dans des conditions difficiles, telles que le pH, les températures et la salinité extrêmes (**Giraffa, 2003**).

L'espèce *E. lactis* a été décrite par **Morandi et al., 2012** comme une nouvelle espèce appartenant au genre *Enterococcus*, étant d'abord isolée dans les produits à base de lait aigre et le lait de brebis frais (**Bauer et al., 2009**).

Les *Enterococcus* sp sont rarement décrites dans les activités antifongiques (**Roy et al., 2009**).

Les *Alternaria alternata* ont été isolés des tiges et des feuilles de tomates et de carottes avec des taches similaires à celles d'*Alternaria* sp qui indiquaient qu'elles étaient responsables de la détérioration et ceci est conforme aux travaux de **Simmons 2007 et Bessed et al., 2014**.

Pour l'identification d'*Alternaria alternata*, les genres ont été d'abord identifiés en étudiant les caractères macroscopiques du mycélien, comme la couleur, la forme, texture, etc, sur les milieux PDA, MEA, CZP et OMA et en comparant les caractères dans le manuel décrit par **Pitt et Hocking, (2009)**. Ces milieux de culture ont des compositions différentes, donnant une variation dans les caractères macroscopiques et permettant ainsi d'identifier les champignons en comparant ces caractères avec d'autres études. L'utilisation de cette méthode pour l'identification des champignons microscopiques est une étape importante. Cependant, chez certains genres, ces caractères peuvent être controversés, trompeurs ou problématiques même pour les spécialistes mycologues (**Raja et al., 2017**).

Les caractéristiques culturelles et morphologiques de 5 isolats étaient très similaires à celles décrites par **Simmons 2007**. Les conidiophores trouvés seuls ou en petits groupes produisaient

des spores dans les chaînes et les conidiospores étaient larges avec des cloisons longitudinales et transversales avec un bec court typique d'*Alternaria alternata*.

L'identification moléculaire par PCR RISA et l'analyse des séquences ITS de l'ADN d'*Alternaria alternata* confirmé notre identification phénotypique. Les régions ITS d'ADN ribosomique peuvent être criblées pour certains gènes. Effectivement, ce dernier est très couramment utilisé car il contient à la fois des régions hautement conservées et variables et aussi avec une présence multiple de copies du gène ribosomal dans tous les organismes, permettant ainsi une détection sensible par PCR (Ciardo *et al.*, 2010).

Dans la présente étude, nous avons démontré que sur 45 souches de bactéries lactiques isolées, seulement 16 souches étaient fortement actives contre les champignons (5 souches d'*Alternaria alternata*). L'activité antifongique de deux souches de BL (2 et 35) identifiées respectivement comme *E. lactis* et *E. faecium*, ont montré une très bonne efficacité antagoniste contre la majorité des souches d'*Alternaria alternata*, la croissance du mycélium et des conidies a été inhibée par des souches de bactéries lactiques. Ces résultats sont similaires à ceux d'autres études menées par (Fhoula *et al.*, 2013; Nora, 2014; Braïek *et al.*, 2018). Des travaux similaires de Serra Djaaboub *et al.*, (2018), ont montré que les isolats d'*Enterococcus faecium* présentaient une inhibition de la croissance radiale jusqu'à 73,89% contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Fusarium graminearum*. Cette inhibition peut s'expliquer par le fait que les bactéries lactiques peuvent sécréter des acides organiques, des toxines et autres produits antifongiques.

Au contraire, la souche (BL4.18) *Lactobacillus plantarum*, rapportée dans la littérature comme l'une des espèces les plus étudiées pour ses propriétés antifongiques. (Sadiq *et al.*, 2019), ont montré une activité antifongique très faible contre les souches d'*A. Alternata*. Des résultats analogues de Fowoyo *et al.*, 2015, ont montré qu'après 24h d'incubation, *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* étaient inhibés par *Lactobacillus plantarum* avec une zone d'inhibition de 2mm, et d'inhibition de 1 mm contre *Mucor* sp.

Mais cela n'empêche pas de dire que l'activité antifongique présentée par *Lactobacillus plantarum* a montré qu'elle est efficace contre l'élimination des champignons d'altérations, par exemple les résultats de Etem Sevgi et Ignatova-Ivanova Tsveteslava, 2015, ont montré que *Lactobacillus plantarum* inhibe totalement *Condida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*. Tandis que, dans l'échantillon avec les souches de *L. plantarum*, retarde et faible la croissance d'*Aspergillus niger* et *Penicillium claviforme*.

**Lavermicocca et coll (2003)** ont suggéré que l'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum* pourrait résulter de nombreux acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide phényllactique.

La sélection effectuée sur un total de 5 souches de bactéries lactiques qui se présentent en une souche *Lactobacillus plantarum* (BL4.18), et deux souches d'*Eterococcus facium* (BL35, BL14.2), deux souches d'*Enterococcus lactis* (BL10, BL4.19), dont les colonies inhibent des champignons du genre *Alternaria alternata*. Une différence de sensibilité de cible fongique aux différentes souches antifongiques, ces dépendances étaient fort probablement liées à la sensibilité aux métabolites produits par les bactéries lactiques. Les zones d'inhibition sont variables, il est évident que l'activité inhibitrice était souche-dépendante.

L'étude de la cinétique de production des métabolites antifongiques dans le milieu MRS a révélé une production majeure de ces métabolites pendant la phase de croissance exponentielle. Une étude de la nature biochimique des métabolites a montré que ces métabolites sont stables à la température, et dénaturé avec le traitement enzymatique sauf la pepsine, lors du traitement avec cette dernière une activité anti fongique s'est manifesté ce qui expliqué que nature de la substance est de nature protéique, et leur activité augmente avec l'augmentation du pH du milieu de culture, beaucoup de travaux ont signalé des résultats similaires (**Rouse et al., 2008; Dalié et al., 2010**).

Aucune perte d'activité antifongique de 5 souches sélectionnées n'a été observée après traitement des métabolites par chauffage à 4°C, 30°C, 45°C, 90°C pendant 20 min. De résultats similaire sont été rapportés quand le surnageant de *Lb. Plantarum* est chauffé à 80°C pendant 1h (**Niku-Paavola et al, 1999**). Cependant, **Gourama (1997)** a montré que l'activité inhibitrice a été perdue lors du traitement du surnageant de *Lb. casei* à 100°C pendant une durée de 10 min.

Aucun changement n'a été observé sur l'activité anti fongique des souches après savoir maintenu les boîtes de Pétri contenant les métabolites de *Lactobacillus* à la réfrigération (4°C) pendant 7 jours.

Le stockage prolongé affecte les métabolites et réduit ou élimine leur effet inhibiteur par une précipitation irréversible ou bien une dénaturation (**Falguni et al., 2010**), cette altération affecte généralement les protéines, ce qui nous a permis de connaître partiellement la nature de la substance inhibitrice.

Le traitement des substances antifongiques par les enzymes protéolytiques Pepsine, Lysozyme, et Trypsine a un effet sur l'activité antifongique (**figure 44**), ce qui suggère que

l'activité antifongique pourrait être de nature protéique, ce qui ne confirme pas les travaux réalisés par **Niku-Paavola et al. (1999)** ayant montré que les enzymes protéolytiques n'ont pas affecté l'activité antifongique de *Lb. plantarum*. Par contre **Mauch et al., 2010; Guo et al., 2011** ont montré que et le traitement protéolytique du surnageant réduit l'activité antifongique de *Lb. brevis* et *Lb. reuteri*.

Une inhibition totale a été observée à pH 7 pour les souches BL14.2, BL4.19 contre Alt37MY et Alt32MA, et une inhibition entre 38% à 90% contre les autres souches *Alternaria alternata*, suivie d'une inhibition qui peut atteindre plus de 80% pour la souche BL14.2 contre Alt37MY à pH 9, et une très faible inhibition soit moins de 20% dans les valeurs de pH 4 et 2 (**figure 45**), ceux-ci suggèrent la contribution des acides organiques dans l'activité antifongique car leur activité dépend fortement du pH et du pKa (**Cabo et al., 2002**). Les composés protéiques peuvent être aussi éliminés par la neutralisation, par exemple la substance antifongique décrite par **Magnusson et Schnürer (2001)** est active à un pH entre 3 et 4.5. **De Muyncka et al. (2004)** ont suggéré également que la neutralisation du surnageant de *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. brevis* et *Lb. coryniformis* subsp *coryniformis* à des valeurs de pH de 5.0, 5.5 et 6.0 entraîne une baisse dans l'activité antifongique. La perte de l'activité inhibitrice par la neutralisation a été aussi prouvée chez *Lb. plantarum*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *W. cibaria* (**Roy et al., 1996 ; Dalié et al., 2010**). La présence de l'activité anti fongique à pH7 chez *Lb. plantarum* suggère que l'inhibition est peut-être due aux acides organiques dissociés (**Eklun, 1983**).

# **CONCLUSION**

---

## CONCLUSION

Dans cette étude nous avons démontré que le lait cru de chamelle, de vache et de chèvre pouvait être de bonnes sources d'isolement des souches BL qui peuvent être utilisées pour la conservation des aliments, et peuvent également être utilisées comme cultures bioprotectrices dans plusieurs types d'aliments ayant la propriété d'inhiber la croissance du champignon phytopatogène et d'altération alimentaire *A. alternata*, qui est connu également pour la production de différentes mycotoxines nocives aux humains et aux animaux..

L'identification phénotypique n'est pas totalement fiable à cause de certains caractères variables, par ailleurs, une identification par les méthodes de la biologie moléculaire est nécessaire. Seize souches appartenant aux trois groupes biochimiques ont montré une activité antagoniste contre l'espèce fongique phytopathogène *A. alternata* et elles ont été davantage caractérisées par des analyses moléculaires

En particulier, les souches *Enterococcus faecium* BL35 et *Enterococcus lactis* BL2 ont montré l'effet inhibiteur le plus fort, suggérant une application possible dans la conservation des aliments. D'autres recherches seront menées pour décrire les mécanismes et/ou la nature des composés impliqués dans l'inhibition de la croissance fongique.

L'étude de la nature biochimique des métabolites a montré que ces derniers sont stables à la température, et garde leur nature avec le traitement enzymatique, ainsi leur activité augmente avec l'augmentation du pH du milieu de culture.

Les bactéries lactiques de part leur innocuité, leurs propriétés technologiques et antimicrobiennes, et plus particulièrement celles du genre *Lactobacillus*, semblent être de bonnes candidates pour la biopréservation des produits alimentaires.

Les différents nutriments disponibles peuvent induire des différences dans la croissance des souches et dans les substances qu'elles produisent, difficile de prédire l'efficacité, au sein d'un produit, d'une souche qui avait présenté des activités antifongiques en milieu de culture.

Les souches utilisées dans cette étude nécessitent une période d'incubation afin d'être capables d'inhiber la croissance fongique, donc pour être plus efficace contre la croissance d'*Alternaria alternata* dans les denrées alimentaires, il faut les utiliser avant la contamination.

## Perspective

D'autres études approfondies sont envisagées dans ce travail, et plus particulièrement la réalisation des essais in vivo sur l'application des bactéries lactiques pour la bio préservation des produits alimentaires contre *Alternaria alternata*, afin de valider l'activité antifongique observée au cours des tests in vitro, et faire une évaluation sensorielle de l'aliment. Ensuite l'utilisation des techniques de chromatographie spécifiques comme HPLC pour identifier et quantifier les métabolites des bactéries lactiques, ainsi que les mycotoxines sécrétées par *Alternaria alternata*.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## References bibliographiques

- Abbo A.S, Idris M.O, Hammad A.M. (2014).** The Antifungal Effects of Four Tomato Rhizosphere Bacillus spp. against *Alternaria Alternata*. International Journal of Science and Research; ISSN (Online). 3 (7): 2319-7064
- AbdAlla S.A, Algam S.A., Elshiekh I., Ahmed M. El Naim. (2014).** In Vitro Screening of Bacillus Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. World Journal of Agricultural Research. 2 :147-150.
- Abdel Massih M. (2007).** Moisissures: identification, sources de contamination et moyens de lutte. Pôle technologique agroalimentaire: 3.
- Abraham T.F. (2013).** Modélisation de la Cinétique de Séchage de la Carotte (*Daucus carota*) [Modeling of Drying Kinetics of Fresh Carrot (*Daucus carota*)]. International Journal of Innovation and Applied Studies ISSN 2028-9324 Vol. 4 No. 2 Oct. 2013, pp. 375-381.
- Adebayo C.O, Aderiye B.I. (2011).** Suspected mode of antimycotic action of brevicin SG1 against *Candida albicans* and *Penicillium citrinum*, Food Control, 22, 1814-1820.
- Agrios G.N. (1997).** Plant pathology, 3rd edition. Academic Press, New York. U.S.A.
- Agrios GN. (2005).** Plant pathology. 5<sup>th</sup>Ed. Elsevier, London. 922: 455
- Ahmad Rather I, Seo B.J, Kumar V.J.R, Choi U.H, Choi K.H, Lim J.H, Park Y.H. (2013).** Isolation and Characterization of a Proteinaceous Antifungal Compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and Its Application as a Food Preservative, Letters in Applied Microbiology, 57, 69-76.
- Ainur Turzhanova, Oxana N. Khapilina, Asem Tumenbayeva, Vladislav Shevtsov, Olesya Raiser and Ruslan Kalendar. (2020).** Genetic diversity of *Alternaria* species associated with black point in wheat grains. PeerJ, DOI 10.7717/peerj.9097.
- Aissa B.F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb. (ed). Librairie moderne. Rouïba. 278-279.
- Ali Esmail A. (2017).** Nutritional and therapeutic importance of *Daucus carota*- A review. IOSR Journal of Pharmacy. Volume 7, Issue 2 Version. 1, PP. 72-88.
- Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. F Contr. 17: 454-461.
- Andersen A, Thrane U. (1996).** Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolites profiles and cultural characteristics. Can. J. Microbiol. 42: 685-689.

- Andersen B, Frisvad J.C. (2004).** Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7507-7513.
- Andrea Patriarca and Virginia Fernández Pinto. (2018).** *Alternaria*. Reference Module in Food Science, 2018, 1–8.
- Andrew D. Armitage, Dez J. B, Ruchard J.H, Charles R.L, Surapareddy S, James W.W, John P.C. (2015).** Discrete lineages within *Alternaria Alternata* species group: Identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal biology.* 119 (2015) 994-1006.
- Andrew D. Armitage, Helen M. Cockerton, Surapareddy Sreenivasaprasad, James Woodhall, Charles R. Lane, Richard J. Harrison<sup>1</sup> and John P. Clarkson. (2020).** Genomics Evolutionary History and Diagnostics of the *Alternaria alternata* Species Group Including Apple and Asian Pear Pathotypes. ORIGINAL RESEARCH published: 23 January 2020 doi: 10.3389/fmicb.2019.03124.
- Arumuganathan K. ET Earle E. (1991).** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218.
- Atanassova M.R, Fernández-Otero C, Rodríguez-Alonso P, Fernández-No I.C, Garabal J.I, Centeno J.A. (2016).** Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 53, 172–181.
- Auréli LECELLIER. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. THESE de Doctorat a L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE. France.
- Avril D et Denis M. (1992).** Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie leeuwenhoek*.j.70: 331-345.
- Axelsson L.T. (2004).** Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 3ème Edt.* Marcel Dekker, Inc, New-York, USA, 1-66.
- Baddilet G. (1991).** Les Alternarioses cutanées. *Revue générale. J. Mycol. Méd.* 118 : 59-71.
- Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjema B, Henni J.E, et Kihal M. (2004).** Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races, *F Microbiol.* (21): 579-588.
- Badis A, Laouabdia S.N, Guetarni D, Kihal M. et Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabie et kabyle". *Sci & Tech.* 23 : 30-37.
- Baek E, Kim H, Choi H, Yoon S, Kim J. (2012).** Antifungal Activity of *Leuconostoc citreum*

and *Weissella confusa* in Rice Cakes, *Journal of Microbiology*, 50, 842-848.

**Baldent (1997)**. Coloration usuelles en bactériologie. *Revue de développement et santé*. Février (1997).

**Banga O. (1963)**. Origin and distribution of the western cultivated carrot. *Genetica Agraria* **17**: 357–370.

**Barefoot S.F, Klaenhammer T.R. (1983)**. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 45(6) :1808- 1815.

**Barkai-Golan R. (2008)**. *Alternaria* mycotoxins. In: *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Eds Barkai-Golan R and Nachman P. Academic Press, San Diego, CA, USA. 185-203.

**Bart P.H.J. Thomma. (2003)**. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* 4(4), 225–236.

**Bartkiene E, Lele V, Ruzauskas M, Domig K.J, Starkute V, Zavistanaviciute P, Bartkevics V, Pugajeva I, Klupsaite D, Juodeikiene G, Mickiene R, Rocha J.M. (2019)** Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms* 8(1):64. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010064>

**Basu P.K. (1974)**. Measuring early blight, its progress and influence on fruit losses in nine tomatocultivars. *Can Plant Dis Surv.* 54: 45- 51.

**Batish V.K, Roy U, Lal R. (1997)**. Grower, S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria—A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 209–225.

**Batista D.C, Lima M.A, Haddad F, Maffia L.A, Mizubuti E.S.G. (2006)**. Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian condition. *Crop Protection.* 25: 664-670.

**Batt C.A, Tortorello M.L. (2014)**. *Encyclopaedia of food microbiology, 2<sup>nd</sup> edition*. ed. Academic Press, Amsterdam.

**Bauer R, Bekker J.P, Van Wyk.N, Du Toit.C, Dicks L.M.T, Kossmann J. (2009)**. Exopolysaccharide production by lactose hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *Int J Food Microbiol* 131: 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.020>.

**Bayrock D.P, Inglede W.M. (2004)**. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 362-368.

**Belkacem Hanfi N, Fhoula I, Semmar N, Guesmi A, Perraud Gaime I, Ouzari H.I, Boudabous A, Roussos S. (2014)**. Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and

ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 2014, pp. 52–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.001>.

**Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson O, Thormar H. (2001).** Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 109, 670–678.

**Bernardeau M, Vernoux J.P, Henri Dubernet S, & Guéguen M. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.

**Bessedet N, Simoneau Ph, Benichou S, Setti B, Kihal M, et Henni D.E. (2014)** Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria sp.* Causing leaf blight of solanaceous plant in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. Vol 8(37), pp. 3422-3434.

**Blagojev N, Škrinjar M, Veskoviaemoračanin S, Šošo V. (2012).** Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites, *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7219-7226.

**Blancard D, Laterrot H, Marchoux G, Candresse T. (2012).** A colour Handbook - Tomato Diseases: identification, biology and control. Manson Publishing Ltd. 688 pp.

**Blancard D. (2009).** Les maladies de la tomate identifier connaître maîtriser. Ed. Quae c/o INRA, Paris, 690 p.

**Booth C. (1971).** The genus *Fusarium* Commonwealth Mycol.Inst. Kew, Surrey, 237 p.

**Botta A, Viala A. (2005).** Toxicologie. Lavoisier 2eme édition. Paris. 261:1994 pp.

**Bottalico A, Logrieco A. (1998).** Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K and Bhatnagar, D. (Eds.) *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Marcel Dekker, Inc, New York, USA. 65-108 pp.

**Boumehira A.Z, Mami A, Hamedi A.R, Henni J.E. et Kihal M. (2011).** Identification and Characterization of Functional and Technological *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Raw Goat and Camel Milk Collected in Algeria. *J. Pure Appl. Microbiol.* 5 (2) : 553-566.

**Bovey R. (1972).** La défense des plantes cultivées traité pratique de phytopathologie et de zoologie agricole. 6eme (ed). *Payot Lausanne*.

**Boysen M.E, Jacobsson K.G, Schnürer J. (2000).** Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (4), 1523-1526.

**Braïek O.B, Cremonesi P, Morandi S, Smaoui S, Hani K, Ghraïri T. (2018).** Safety characterisation and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing *Enterococcus lactis* 4CP3 strain. *Microbial Pathogenesis* 118:32–38.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.005>

**Buxton E W. (1954).** Heterokaryosis and variability in *Fusarium. oxysporum. f. sp. Gladioli*, *J Gem, Micro*, 10:71-8.

**Cabo M.L, Braber A.F, Koenraad P.M. (2002).** Apparent Antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* Is due to acetic acid in the medium, *Journal of Food Protection*, 65, 1309-1316.

**Calmes B. (2011).** Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées: Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-Stransférases. Thèse de doctorat Spécialité: Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale Ecole Doctorale VENAM.

**Campbell R. (1969).** An electron microscope study of spore structure and development in *Alternaria brassicicola*. *J. Gen. Microbiol.* 54, 381–392.

**Caplice E, Fitzgerald G.F. (1999).** Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol*, 50, 131–149.

**Carr F.J, Chill D, Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, pp. 281–370. DOI: 10.1080/1040-840291046759.

**Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P. and O'Connell R.J. (2002).** Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 216–224.

**Cavagnaro P. F, Chung S.M, Szklarczyk M, Grzebelus D, Senalik D, Atkins A.E. et Simon P.W. (2008).** Characterization of a deep-coverage carrot (*Daucus carota* L.) BAC library and initial analysis of BAC-end sequences. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 273-288.

**Chaerani R, Voorrips R.E. (2006).** Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen,

**Champion R. (1997).** Identifier les Champignons Transmis par les Semences. INRA. Paris. Charvet Jean-Paul Le blé dans le monde, Evolution récente de la consommation, de la commercialisation et de la production. *Annal de géographie.* T.86, n° (478). pp 686-723, 1997. <http://www.presse.fr>.

**Chapeland Leclerc F, Papon N, Noel T, Villard J, (2005).** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses), *Revue Française des Laboratoires*, 373, 61-66.

**Chaux C et Foury C. (1994).** *Productions légumières - Tome 2 : Légumes feuilles, tiges, fleurs, racines, bulbes.* Éditions Tec & Doc, Paris, 639 p.

**Christine J. (2000).** Maladies, insectes nuisibles et utiles de la pomme de terre. Edition IRDA sainte-foy Québec. Page 16.

**Ciardo D.E, Lucke K, Imhof A, Bloemberg G.V, Böttger E.C. (2010).** Systematic internal

transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-year study. *J. Clin Microbiol*, 48, 2809-13.

**Cintas L.M, Casaus M.P, Herranz C, Nes I.F et Hernández P.E. (2001).** Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *F Sci Tech Int*; 7 (4):281–305.

**Clotault J. (2009).** *Impact de la sélection sur l'expression et la variabilité de séquences de gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez la carotte cultivée.* Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 183 p.

**Coallier Ascah J, Idziak E.S. (1985).** Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on Production of Aflatoxin, *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 163-167.

**Coloretti F, Carri S, Armaforte E, Chiavari C, Grazia L, Zambonelli C. (2007).** Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 245–250.

**Condon S. (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen, *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 269-280.

**Cordova Lopez Jesus Antonio. (1998).** Isolement, Identification Et Physiologie Des Champignons Thermophiles En Vue De La Production De Lipases Par Fermentation En Milieu Solide

**Corsetti A, Valmorri S. (2011).** Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 111-118.

**Criquet S, Calvert V. (2008).** IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie.

**Crowley S, Mahony J, Van Sinderen D. (2013).** Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 2013, pp. 93–109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>.

**Dal Bello F, Clarke C, Ryan L, Ulmer H, Schober T, Strom K, Sjögren J, Van Sinderen D, Schnürer J, Arendt E.K. (2007).** Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* 45, 309–318.

**Dalié D.K.D, Deschamps A.M, Richard-Forget F. (2010).** Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, *Food Control*, 21, 370-380

**Datar V.V, Mayee CD. (1998).** Assessment of loss in tomato yield due to early blight. *IndianPhytopathology.* 34: 191-195.

**Davaud A. (1991).** Participation aux recherches effectuées sur "L'étude de la compatibilité végétative chez des isolats brésiliens et ivoiriens du *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaidis*", pp. 1-23.

**De Aguirre L, Hurst S.F, Choi J.S, Shin J.H, Hinrikson H.P, Morrison C.J. (2004).** Rapid

Differentiation of *Aspergillus* Species from Other Medically Important Opportunistic Molds and Yeasts by PCR-Enzyme Immunoassay, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (8), 3495-3504

**De Man J. C, Rogosa M, Sharpe M.E, (1960).** A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 1960, pp. 130-135. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.

**De Muyncka C, Leroya A.I.J, De Maeseneire S, Arnautb F, Soetaerta W, Vandamme E.J. (2004).** Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites, *Microbiological Research*, 159, 339-346.

**De roissart H et Luquet F.M. (1994).** Bactéries lactiques, aspect fondamentaux et technologiques, (Ed) Loriga France, tome I. pp 25 – 590.

**De Vos P, Garrity G.M, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer K.H, Whiteman W.B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes, 2<sup>nd</sup> Edition. Vol 3*, Springer.

**De Vuyst L and Vandamme E.J. (1994).** Bacteriocine of lactic acid bacteria. Blackies academic and professional London.

**Delavenne E, Mounier J, D'eniél F, Barbier G, Le Blay G. (2012).** Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period, *International Journal of Food Microbiology*, 155, 185-190.

**Detomi C. (2009).** Environmental microflora which could contaminated the milk. Traineeship report. Engineering school of Purpan, Toulouse, France. 54p

**Devoyod J.J et Poullain F. (1988).** Les leuconostocs: propriétés, leur rôle en technologie laitière. *Lait*, 68: 249-280.

**Devriese L.A, Pot B et Collins M.D. (1993).** Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. *J of App Bacter.* 75: 399–408.

**Digaitiene, A, Hansen A, Juodeikiene G, Eidukonyte D, Josephsen J. (2012).** Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 112, 732–742.

**Dimov S, Ivanova P, Harizanova N. (2005).** Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Equip.* 19, 4–10.

**Djadouni F et Kihal M. (2012).** Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides Against Spoiling Germs in Foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55 (3): 435 – 443

**Djerbi M. (1990).** Méthodes de diagnostic du bayoud du palmier dattier. (Methods of

diagnosing of date palm's bayoud disease.) Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 20, 1990, pp. 607–613. DOI: 10.1111/j.1365-2338.1990.tb00184.x. In French.

**Djossou O. (2011).** Mycoflore post-récolte du café robusta et utilisation des bactéries lactiques pour le contrôle des moisissures mycotoxinogènes et de l'Ochratoxine A. thèse de Doctorat en Biologie des Populations et Ecologie. Université Paul Cézanne, Aix Marseille III. 123p

**Dortu C, Thonart P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1), 143-154.

**Doumandji A, Hellal A, Saidi N. (2010).** Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, 4: 25-47.

**Downie S.R et Katz Downie D.S. (1996).** A Molecular Phylogeny of *Apiaceae*

**Dragacci S, Grosso F, Frémy J.M. (2005).** Analyse et détection des mycotoxines, Technique de l'ingénieur.

**Drosinos E.H, Paramithiotis S, Kolovos G, Tsikouras I, Metaxopoulos I. (2007).** Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, 24, 260–270.

**Durlu Ozkaya F, Xanthopoulos V, Tunail N, et Litopoulou zanetaki E. (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolate from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 861-870.

**Ekaterina H.T, Joseph S, Kobus B, Barry M.P. (2011).** Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal biology* 115 (2011) 1163 e1173.

**Eklun T. (1983).** The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels, *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 383-389.

**Eklund H, Cambillan C, Sjoberg B.M, Holugren A, Jornvalle H, Hoog J.O et Branden C.I. (1984).** Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins *EMBO. J.* 3: 1443-1449.

**Elanai S. (1968).** The cytogenetics of the conidium in *Microsporium gypseum* and of pleomorphism and the dual phenomenon in fungi. *Mycologia*, 60, 999-1015.

**Elliott JA. (1917).** Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *Am J Bot* 4:439–476

**Ellis M.B, Gibson I.A.S. (1975).** *Alternaria solanino*. 45 set 48. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.

**Ellis M.B. (1976).** More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew 3.

- Emilie Delavenne. (2012).** Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus. These de doctorat. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. ffNNT: 2012 BRES0085ff.
- Eyquem A, Alouf J, et Montagnier L. (1998) :** Traité de microbiologie clinique. Picci.1055p.
- Falguni P, Shilpa V, Mann B. (2010).** Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02, International Journal of Dairy Technology, 63, 70-76.
- Feldgarden M, Young S.K, kodria C.D, Zeng Q, Koehesen M, Alvarado L, Berlin A, Freedman E, Gellesch M.D, Larson L, Lewis B, Mehta T, Park D, Pearson M, Roberts A, Saif S, Shea T, Sheony N, Sisk P, Stolte C, Sykes S, Walk T, Withe J, Yandava C, Gimore M, Manson J, Palmer K, Carniol K, Lander E, Nusbaum C, Galagan J, Birren B. (2009).** The Genome sequence of *Enterococcus faecalis* strain AR01/DG. 1-1531.
- Felis G.E and Dellaglio F. (2007).** Taxonomy of lactobacilli and Bifidobacteria. Current issues in Intestinal Microbiology 8, 44-61.
- Felsenstein J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Feuilhade de Chauvin M. (2005).** New diagnostic techniques, J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol., 19 (1), 20-24
- Fhoula I, Najjari A, Turki Y, Jaballah S, Boudabous A, Ouzari H. (2013)** Diversity and Antimicrobial Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rhizosphere of Olive Trees and Desert Truffles of Tunisia. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 405708. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/405708>
- Filtborg O, Frisvad J.C and Thrane U. (1996).** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102.
- Florou Paneri P, Christaki E et Bonos E. (2013).** Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes p 590
- Fontaine R, Clain C, Albon B, FDGDON. (2018).** Tuta absoluta : la mineuse de la tomate, 2p
- Fowoyo P.T, Uzoma E.O. (2015).** Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit. *Journal of Microbiology Research*. pp 95-100
- Franceschi S. (1994).** Tomatoes and risk of digestive- tract cancers. *International Journal of Cancer* 59: 181-184.
- Franz C.M.A.P, Stiles M.E, Schleifer K.H, Holzappel W.H. (2003).** Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105–22.

- Fuller R. (1989).** Probiotics in man and animals. *J. Appl. Microbiol.* 66:365-378.
- Gajbhiye Milind & Kapadnis Balu. (2017).** Bio-efficiency of Antifungal Lactic Acid Bacterial Isolates for Pomegranate Fruit Rot Management. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences.* 88. 10.1007/s40011-017-0891-7.
- Galvez A, Abriouel H, Bem Omar N, Lucas R. (2011).** Food Applications and Regulation : Prokaryotic Antimicrobial Peptides : From Genes to Applications. Eds Drider, D et Rebuffat, S., Spain.
- Ganesan B, Seefeldt K, Koka R.C, Dias B, Weimer B.C. (2004).** Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli, *International Dairy Journal*, 14, 237-246.
- Garganese F, Schena L, Siciliano I, Prigallo M.I, Spadaro D, De Grassi A, Ippolito A, Sanzani S.M. (2016).** Characterization of Citrus-Associated *Alternaria* Species in Mediterranean Areas. *PLoS ONE*, 11, e0163255
- Garofalo C, Zannini E, Aquilanti L, Silvestri G, Fierro O, Picariello G, Clementi F. (2012).** Selection of Sourdough Lactobacilli with Antifungal Activity for Use as Biopreservatives in Bakery Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7719–7728.
- Garvie E.I. (1984).** Taxonomy and Identification of Bacteria Important in Cheese and Fermented Dairy Products., in *Advances in The Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, edited by F. L. Davies and B. A. Law (Elsevier Applied science Publishers LTD, England,) pp.35-67.
- Gaspar P, Carvalho A.L, Vinga S.A, Santos H et Neves A.R. (2013).** From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biothechnology Advances*, 31: 764-788.
- Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan T.M. (2001).** Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar- type cheesemaking factory. *Int Journal of Food Microbiol*, 71, pp.177-188.
- Gerbaldo G.A, Barberisa C, Pascuala L, Dalceroa A, Barberisa L. (2012).** Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties, *FEMS Microbiology Letter*, 332, 27-33.
- Gilli C. (2007).** Le chancre bactérien de la tomate, Station de recherche Agroscopechangins. Wädenswil ACW, centre des fougères. Vol 39, n° (2), 141-142p.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm E.B, Stampfer M.J, Colditz G.A, Willert W.C. (1995).** Intake of carotenoids and retinol to risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 87: 1767-1776.
- Giraffa G. (2003)** Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88:215-

222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)

**Gourama H, Bullerman L.B. (1995).** Inhibition of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* Species, *Journal of Food Protection*, 58, 1249-1256.

**Gourama H. (1991).** Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in the presence of Genetics, and breeding for resistance (review). *J Gen Plant Pathol.* 72: 335-347.

**Gray J and Bemiller J. (2003).** Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive*

**Grogan, RG. Kimble, KA. Misaghi, I. (1975).** A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology.* 65: 880-886.

**Guessas B et Kihal M. (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 339- 342.

**Guessas B, Adjoudj F, Hadadji M et Kihal M. (2012).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Dhan, a Traditional Butter and Their Major Technological Traits, *World Appl Sci. J.* 17: (4) 480-488.

**Guessas B. (2007).** Les potentialités métaboliques des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre dans le bio-contrôle de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat. Université d'Oran.

**Guillo N. (1958).** Élaboration par *Lactobacillus acidophilus* d'un produit actif contre *Candida albicans*, *Annales de l'institut Pasteur*, 95, 194-207.

**Guiraud J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. 1<sup>ère</sup> Edt, Dunod. Paris. 136-144.

**Guo J, Mauch A, Galle S, Murphy P, Arendt E.K, Coffey A. (2011).** Inhibition of growth of *Trichophyton tonsurans* by *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.* 111, 474–483.

**Gwary D.M, Nahunnaro, H. (1998).** Epiphytotics of early blight of tomatoes in North eastern Nigeria. *Crop Protection.* 17: 619- 624.

**Hageskal G, Knutsen A.K, Gaustad P, de Hoog G.S, Skaar1 I. (2006).** Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (12), 7586-7593.

**Haougui1 A, Basso1 A, Kimba A, Delmas P. (2013).** Vigilance contre une épidémie de la maladie des feuilles en cuillère de la tomate (TYLC) sur *Datura stramonium* dans la zone périurbaine de Niamey, 1p.

**Harrigan W.F. et MacCance M.E.C. 1976.** *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Press, London and New York.

**Haskard C.A, El-Nezami H.S, Kankaanpää P.E, Salminen S, Ahokas J.T. (2001).** Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3086- 3091.

**Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Frye S, Raad I.I, Kontoyiannis D.P. (2005).** Use

of the DiversiLab System for Species and Strain Differentiation of *Fusarium* Species Isolates, *J. Clin. Microbiol.*, 43 (10), 5278-5280.

**Heiser C, Andersson G. (1999).** New solanums. In: Janick.j. (ed) Perspectives on New Crops and New Uses. *ASHS Press. Alexandria. Virginia.* 379-384.

**Helene T, Djamila A.H.L, RoquesC. (2015).** Phenotypic and genotypic characterisation of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 168-1605.

**Henni J.E, Boisson C et Geiger J.P. (1994).** Variabilité du pouvoir pathogène chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. *Phytopath. Medt*, 33: 10-16.

**Hermann C.T, Bruno A.D, Oscar S.T et Hounnankpon Y. (2018).** Les services de pollinisation des abeilles sauvages, la qualité et le rendement en fruits de la tomate (*lycopersicon esculentum* mill.) dans la commune de kétou au sud bénin. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, 32 (2018) 239 – 258.

**Herreros M.A, Sandoval H, Gonzalez L, Castro J.M, Fresno J.M et Tornadijo M.E. (2005).** Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22 :455-459

**Hinrikson H.P, Hurst S.F, De Aguirre L, Morrison C.J. (2005).** Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1), 129-137

**Hirsch P.R. (1979).** Plasmid determined Bacteriocin Production by *Rhizobium leguminosarum*, *Journal of General Microbiology*, 113, 219-228.

**Holzappel W.H, Wood J.B. (2014).** Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. *Wiley BlackwellUK.* 30-257.

**Honda Y, Nanba N and Nozu M. (1990).** A further study on ultrastructural aspects of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bull. Fac. Agr.* 24, 39–46.

**Honda Y, Sota K and Nozu M. (1987).** An ultrastructural study of photo-induced conidiogenesis and differentiation in *Alternaria solani*. *Bull. Fac. Agr.* 21, 141–154.

**Hu C.B, Malaphan W, Zendo T, Nakayama J, Sonomoto K. (2010).** Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*76, 4542–4545.

**Hwanhlem N, Buradaleng S, Wattanachant S, Benjakul S, Tani A, Maneerat S. (2011).** Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.*, 22: 401-407.

- Hyun Min J, Kyung Ah K, Kil Sun M, Young Tae A, Jung Hee L, Chul Sung H, Myung J.H, Dong Hyun K. (2012).** *Lactobacillus helveticus* HY7801 ameliorates vulvo vaginal candidiasis in mice by inhibiting fungal growth and NF-kB activation, *International Immunopharmacology*, 14, 39-46.
- IDF Standard 122C. (1996).** Milk and Milk Products Preparations of Samples and dilutions for microbiological examination. Brussels: International Dairy Federation, 1996.
- Igarashi Y, Ogawa M, Sato Y, Saito N, Yoshida R, Kunoh H, Onaka H and Furumai T. (2000).** Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TPA0569. *J. Antibiot.*, 53(10): 1117-22.  
in *Microb*, 28(4):281–370
- Inga Bazukyan, Lusine Matevosyan, Anna Toplaghalsyan and Armen Trchounian. (2018).** Antifungal activity of lactobacilli isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0619-y>
- Iorizzo M, Senalik D.A, Grzebelus D, Bowman M, Cavagnaro P.F, Matvienko M, Ashrafi H, Van Deynze A et Simon P.W. (2011).** De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* 12: 389.
- Janssen H and Hancock R.E.W. (2009).** Antimicrobial properties of lactoferin. *Biochimie* 91, 19-29.
- Jean Claud F, Jayane I.R, Carol T, Max F. (2003).** Répertoire général des aliments- table de composition, Tec et Doc-INRA.
- Jin J, Lee Y.K, Wickes B.L. (2004).** NOTES Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (9), 4293-4296.
- Joly P. (1964).** Le genre *Alternaria*. *Encyclopédie Mycologique*, Ed. J. P. Lechevalier. Paris. p 250
- Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E., Zitter T.A. (1997).** Compendium of Tomato Diseases p. 1-8, 13-15, 28-29. APS press.
- Joseph L.M, Koon T.T, Man W.S. (1998).** Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudo cercospora* species. *Canadian Journal of Botany*. 76, 2119-2124.
- Karimi R, Sohrabvandi S, Mortazavian A.M. (2012).** Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 437-452.
- Kawamura C, Moriwaki J, Kimura N, Fujita Y, Fuji S, Hirano T, Koizumi S and Tsuge**

- T. (1997).** The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin-deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 446–453.
- Kawamura C, Tsujimoto T and Tsuge T. (1999).** Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. PlantMicrobe Interact.* 12, 59–63.
- Kempler G.M. et Mc Kay L.L. (1980).** Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 39: 956-927.
- Kersani I. (2018).** Production d'exopolysaccharides par des bactéries lactiques, Mémoire de doctorat. Université Ahmed Ben Bella Oran1.
- Khalid K. (2011).** An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 1, 1–13
- Khandakar Rayhanul Kabir, Rafiqul Islam, Sabir Hossain, Sudip Paul and Ibrahim Khalil. (2014).** Antagonism of Lactic Acid Bacteria Against Selected Pathogenic Bacteria and Spoilage Fungi. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 14 (3): 193-198, 2014.
- Khedid K, Faid M, Mokhtarib A, Soulaymani A, Zinedine A. (2009).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol Res* 164:81-91. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.008>.
- Khella N. (2011).** Contribution à la lutte intégrée contre la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) sous serre. 12p.
- Klaenhammer T. R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Klaenhammer T.R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochi.*70: 337-349.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C et Reuter G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Intl. J. Food. Microbiol.* 41: 103-125.
- Koenig H. (1995).** Guide de mycologie médicale Ellipdes. P: 13, 171, 172.
- König H et Fröhlich J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer verlag, Berlin Heidelberg.
- Krakova L, De Leo F, Bruno L, Pangallo D, Urzì C.(2015).** Complex bacterial diversity in the white biofilms of the Catacombs of St. Callixtus in Rome evidenced by different investigation strategies. *Environmental Microbiology*, 17, 2015, pp. 1738-1752. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12626>.
- Kumar M. (2014).** Ethnobotanical studies on some medicinal plants: a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*; 3(8): 342-361.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016).** **MEGA7:** Molecular Evolutionary Genetics

Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 2016, pp. 1870–1874. DOI:<https://doi.org/10.1093/molbev/msw0>.

**Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A and Sarker S.D. (2005).** The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L) seeds. *J Herb Pharmacother*; 5(1):61-72.

*Lactobacillus* species, Ph. D, Thesis, Nebraska University.

**Laref N, Guessas B. (2013).** Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13, 2013, pp. 80–88. ISSN: 1843-6099 (online).

**Larpent J.P, Larpent G.M. (1990).** Mémento technique de microbiologie. Lavoisier Tecet Doc.Paris. PP471.

**Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. (2003).** Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products, *Applied and Environmental Microbiology*, 69,634-640.

**Lawrence D.P, Gannibal P.B, Peever T.L, Pryor B.M. (2013).** The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. *Mycologia*. 105: 530 -546.

**Le Clerc V. (2001).** Etude de la diversité génétique chez la carotte (*Daucus carota* L.): mise au point de stratégies d'analyse et de régénération des ressources génétiques. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 125 p.

**Le Lay C, Akerey B, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M. (2008).** Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1630-1639.

**Lee C.R, Cho I.H, Jeong B.C.J, Lee S.H. (2013).** Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10, 4274–4305.

**Lee H.B, Patriarca A, Magan N. (2015).** *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, 43, 2015, pp. 93-106. DOI: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.2.93>.

**Leiminger J, Bahnweg G, Hausladen H, (2010).** Population genetics—consequences on earlyblight disease. Twelfth Euro Blight work shop Arras (France), *PPO-Special Report*. 14: 171-178.

**Leiva G.S, Guillermo G.B. (2015).** *Solanum lycopersicum* L. “tomato” and *Solanum muricatum* Aiton “melon pear” (Solanaceae) two edible fruits used in Pre-Hispanic Peru. *Arnaldoa* 22 (1): 201 – 224.

**Leiva S, Zapata M, Gayoso G, Chang L, AND Leiva M. (2013).** Frutas silvestres de los Andes Centrales de América. *Arnaldoa* 20(2): 315-344.

- Leyral G et Vierling E. (2001).** Microbiologie et Toxicologie des aliments. 3<sup>ème</sup> Edition. Lavoisier, Paris, France.
- Linás M.D, Morassin P.R. (1999).** Actualités sur *Alternaria*: écologie, Revue Française d'allergologie. 349- 355.
- Lipinska L, Klewicki R, Klewicka E, Kolodziejczyk K, Sojka M, Nowak A. (2016).** Antifungal activity of *Lactobacillus* sp bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol. BioMed Res Int 2016:5897486.2016. <http://doi.org/10.1155/2016/5897486>.
- Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y. (2014).** Biodiversity of lactic acid bacteria. In: Zhang H, Cai Y, (Eds.). Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice. Dordrecht: Springer, pp. 103–203. ISBN: 97894-017-8840-3. DOI: 10.1007/978-94-017-8841-0.
- Logrieco A, Bottalico A, Solfrizzo M, Mule G. (1990).** Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. Mycologia. 82: 501-505.
- Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M. (2009).** Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal. 2 (2): 129-140.
- Luchese R.H, Harrigan F. (1990).** Growth of, and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values, Journal of Applied Bacteriology, 69,512-519.
- Magnusson J, Schnürer J. (2001).** *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound, Applied and Environmental Microbiology, 67,1-5.
- Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. (2003).** Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129-135.
- Mahrous H, Mohamed A, El-Mongy M.A, El-Batal A.I, Hamza H.A. (2013).** Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus* spp. isolated from some dairy products under different culture conditions. Food Nutr. Sci. 4, 342–356.
- Maiza K, Brac P et Hammiche R.A. (1993).** Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. Médicaments et Aliments: l'approche Ethnopharmacologique, Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11 e Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, pp. 169-171.
- Mami A, Henni J.E et Kihal M. (2008).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. World J of Dair & F Sci. 3 (2): 39-49.

- Mandal V, Kumar S, Mandal N.C. (2013).** Production and partial characterization of an inducer dependent novel antifungal compound(s) by *Pediococcus acidilactici* LAB 5, Journal of the Science of Food and Agriculture, 93,2445-2453.
- Mario Masiello, Stefania Somma, Antonia Susca, Veronica Ghionna, Antonio Francesco Logrieco, Matteo Franzoni, Stefano Ravaglia, Giuseppe Meca and Antonio Moretti. (2020).** Molecular Identification and Mycotoxin Production by *Alternaria* Species Occurring on Durum Wheat, Showing Black Point Symptoms. *Toxins* 2020, 12, 275; doi:10.3390/toxins12040275.
- Mauch A, Dal Bello F, Coffey A, Arendt E.K. (2010).** The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to invitro inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley, *International Journal of Food Microbiology*, 141,116-121.
- Merzouk Y. (2015).** Optimisation des conditions de fermentation et de préservation du lait cru de chamelle par les bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress. Thèse de Doctorat. Université d'Oran.
- Messiaen C.M, Blancard D, Rouxel F, Lafon R. (1991).** Les maladies des plantes maraichères, INRA Paris. 552pp.
- Messiaen C.M, et Cassini R. (1968).** Recherches sur les Fusarioses, IV. La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiphytes CH* : 19, pp. 387 – 454.
- Mickaël Lecomte. (2013).** Analyse des mécanismes de défense de la carotte (*Daucus carota*) face au champignon pathogène *Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou brûlure foliaire. Thèse de doctorat. Université d'Angers, 2013. Français.
- Milet Asma. (2017).** Isolement de microorganismes à partir du sol des régions arides et sélection d'isolats à effet antagoniste sur l'agent de l'Alternariose. These de doctorat. N° d'ordre : 158/DS/2017 N° de série : 01/Mic BIO/2017.
- Mills S, Stanton C, Hill C, & Ross R. (2011).** New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299–329.
- Mokoena Mduduzi Paul. (2017).** Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 2017, 22, 1255; doi:10.3390/molecules22081255
- Mollapour M, Piper P.W. (2008).** Weak Organic Acid Resistance of Spoilage Yeasts, In: S.V. Avery, M. Stratford, P. Van West, *British Mycological Society Symposia Series*, Elsevier, 290 pp.
- Monnet V, Atlan D, Béal C, Champomier Vergès M.C, Chapot Chartier M.P, Chouayekh**

- H, Coccagn Bousquet M, Deghorain M, Gaudu O, Gilbert C, Guédon E, Guillouard I, Goffin P, Guzzo J, Hols P, Juillard V, Ladero V, Lindley N, Lortal S, Loubière P, Maguin E, Monnet C, Ru, F, Tourdot Maréchal R and Yvon, M. (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments, Métabolisme et ingénierie métabolique, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 271-449.
- Morandi S, Cremonesi P, Povolo M, Brasca M. (2012).** *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62(8):1992–1996. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030825-0>
- Nair P.S et Surendran p.K. (2005).** Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. J of cult colle. 4: 48-52.
- Narayanapillai U, Duraisamy S, Balakrishnan S, Kanagaraj N et Ramasamy G. (2012).** Production of bacteriocin and their application in food products, Asi Pac J of Trop Biome, S406-S410.
- Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P. (2011).** Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food, Journal of Food Science, 76, 305-311.
- Neergaard P. (1945).** Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*: taxonomy, parasitism, economic significance. Oxford University Press, London. 2-287.
- Negi P.S. (2012).** Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, 156, 7-17.
- Nelson P.E, Tousson T.A et Marasas W.F. (1983):** *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Penn. Stat. Univer. Press. 193 p.
- Niku Paavola, M.L, Laitila A, Mattila Sandholm T, Haikara A. (1999).** New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 86, 29-35.
- Noda F, Hayashi K, Takeji M. (1980).** Antagonism Between Osmophilic Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Brine Fermentation of Soy Sauce, Applied and Environmental Microbiology, 40, 452-457.
- Nora Laref. (2014).** L'étude de l'activité antifongique des lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus* sp. These de doctorat. Université d'Oran 1.
- O'Keeffe T, Hill C. (1999).** Bacteriocins Potential in Food Preservation, *Encyclopedia of Food Microbiology*, 183-191.
- Okkers D.J, Dicks L.M.T, Silvester M, Joubert J.J, Odendaal H.J. (1999).** Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*, Journal of Applied Microbiology, 87, 726-734.

- Ostry V. (2008).** *Alternaria* mycotoxins an overview on chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*. 1: 175-188.
- Pamplona J. (2004).** El poder medicinal de los alimentos, 4a reimp. Casa Editora Sud americana, Buenos Aires, Argentina.
- Pangallo D, Chovanová K, Drahovska H, De Leo F, Urzì C. (2009).** Application of fluorescence internal transcribed spacer-PCR (f-ITS) for the cluster analysis of bacteria isolated from air and deteriorated fresco surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:868-872. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.04.011>
- Panigrahi, S. (1997).** *Alternaria* toxins. In: D'Mello, J.P.F. (Ed.) *Handbook of plant and fungalttoxins*. CRC Press, Boca Raton, USA. 319-337.
- Parada J.L, Caron C.R, Medeiros A.B.P, Soccol C.R. (2007).** Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50, 521–542.
- Patil M.M, Pal A, Anand T et Ramana K.V. (2009).** Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. *Ind J of Biotech*. 9:166-172.
- Patterson C.L. (1991).** Importance of chlamydo spores as primary inoculum for *Alternaria solani*, incitant of collar rot and early blight of tomato. *Plant Disease*. 75: 274-278.
- Perczak A, Goliński P, Bryła M, Waśkiewicz A. (2018).** The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69(1):32–45. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3051>.
- Perez R.H, Zendo T, Sonomoto K. (2014).** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb. Cell Fact*. 13, S3.
- Peron J.Y. (2006).** Références Productions légumières: 2ème édition. Synthèse Agricole, 696 p.
- Piard J.C, Desmazeaud M. (1991).** Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*. 71(5), 525-541.
- Pickle K.R. (2009).** The Effects of Photo, Physical and Mechanical (PPM) Pre-treatments in Controlling Certain Pests and Diseases in Carrots, *Daucus carota* L. var. Sativus cv. Carson. Thèse de doctorat. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, 95 p.
- Pitt J. I, Hocking A.D. (2009).** *Fungi and Food Spoilage, 3th ed*, Springer Science, New York, USA.
- Pitt J.J & Hocking A.D. (1999).** *Fungi and food spoilage* Second Ed. Aspen Publications. pp.
- Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. 1-106.

- Prema P, Smila D, Palavesan A, Immanuel G. (2008).** Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food Bioprocess Technol.* 3, 379–386.
- Pryor B.M, Gilbertson R.L. (2000).** Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol Res* 104(11):1312–1321
- Quinto E.J, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. (2014).** Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr. Sci.*, 5, 1765–1775.
- Rahmeh R, Alomirah H, Akbar A, Sidhu J. (2019).** Composition and Properties of Camel Milk. In: Khalid Javed (ed) *Milk Production, Processing and Marketing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82592>
- Rainey F.A, Ward Raney N, Kroppenstedt R.M, Stackebrandt E. (1996).** The genus *Nocardopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of Nocardopsaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 1996, pp. 1088-1092. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1088>.
- Raja H.A, Miller A.N, Pearce C.J, Oberlies N.H. (2017).** Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80, 756–770.
- Rajendhran J, Gunasekaran P. (2011).** Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research*, 166, 99-110.
- Rappily F. (1998).** Evolution historique des concepts de résistances des plantes Aux agents pathogènes. *Cahiers Agricultures* 7(3) : 223-228.
- Reduron J.P. (2007).** Ombellifères de France - tome 2 (Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest, 27). Société Botanique du Centre-Ouest, 564 pp.
- Reviews in Food Science and Safety*, 2: 1-21.
- Ross R.P, Morgan S, Hill C. (2002).** Preservation and fermentation: past, present and future, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.
- Rotem J. (1994).** The genus *Alternaria*, biology and pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota. 326pp.
- Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Van Sinderen D. (2008).** Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 915-923.
- Roy U, Kaushik JK, Grover-Batish VK. (2009).** Partial purification of an antifungal protein produced by *Enterococcus faecalis* CHD 28.3. *Ann Microbiol* 59: 279-284.

- Rubatzky V.E, Quiros C.F et Simon P.W. (1999).** Carrots and related vegetable Umbelliferae. CABI, Walling ford, 310 p.
- Ruiz Rodríguez L.G, Mohamed F, Bleckwedel J, Medina R, De Vuyst L, Hebert E.M and Mozzi F. (2019).** Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria isolated from Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Front Microbiol* 10:1091. [https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2019.01091](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091)
- Sadiq F.A, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W. (2019).** Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, pp. 1403-1436. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>.
- Saidi N, Guessas B, Bensalah F, Badis A, Hadadji M, Henni J.E, Prevost H. et Kihal M. (2002).** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du Lait Cru de Chèvre des Régions Arides d'Algérie. *J Alg des Rég Ar* .1:1112-3273.
- Salas M.L, Mounier J, Valence F, Coton M, Thierry A, Coton E. (2018).** Antifungal microbial agents for food biopreservation- A review. *Microorganisms*, 5, article 37. DOI:<https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>. <https://www.mdpi.com/2076-2607/5/3/37>
- Samson R.A, Seifert K.A, Kuijpers A.F.A, Houbraken J.A.M.P and Frisvad J.C. (2004).** Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial b-tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49: 175-200.
- Santos G.G, Mattos L.M, Moretti C.L. (2016).** Quality and Occurrence of Mycotoxins in Tomato Products in the Brazilian Market. *EnzEng* 5:3. <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000156>.
- Sawa N, Okamura K, Zendo T, Himeno T, Nakayama J, Sonomoto K. (2005).** Identification and characterization of novel bacteriocins produced by *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1181–1190.
- Schillinger U. et Lucke FK. (1987).** Identification of lactobacilli from meat and meat products. *F Microbiol.* 4:199-20
- Schleifer K.H, Ludwig W. (1995).** Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 461–7.
- Schnürer J, Magnusson J. (2005).** Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives, *Trends in Food Science & Technology*, 16,70-78.
- Schwarzer D, Finking R, Marahiel M.A. (2003).** Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports*, 20, 275-287.

- Scott P.M. (2001).** Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins, *Journal of AOAC International*. 84: 1809- 1817.
- Scott P.M. (2004).** Other mycotoxins. In: Magan, N. and Olsen, M. (Eds.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 406- 409.
- Shankara N, Joep V.L.D.J, Marja D.G, Martin H, Barbara V.D. (2005).** La culture des tomates production, Transformation et commercialisation. Série: Agrodok (1989). N° 17, 8-24p
- Shekh R, Upadhyay K, Singh S.M, Roy U. (2009).** Inhibition of *Candida albicans* and two selected Gram-negative pathogens by Polar *Enterococcus faecalis* and *Carnobacterium* sp., *Research Journal of Microbiology*, 4, 138-142.
- Shepard B.D et Gilmore M.S. (2002).** Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect*, 4 :215-224.
- Sherf A.F, Macnab A.A. (1986).** Vegetable Diseases and Their Control. 2<sup>ème</sup> (ed). Wiley-IEEE.
- Simmons E.G. (1967).** Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59:67–92
- Simmons E.G. (1992).** *Alternaria* taxonomy: current status, view point, challenge. In: Chelkowski J, Visconti A (eds) *Alternaria* biology, plant diseases and metabolites. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 1–35
- Simmons E.G. (1993).** *Alternaria* themes and variation (63-72). *Mycotaxon* 48, 109-140.
- Simmons E.G. (2007).** *Alternaria* an identification manual: CBS biodiversity series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, the Netherlands. 775p.
- Sinclair J.B, Dhingra O.B. (1995).** Basic plant pathology methods. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press, 1995. ISBN: 9780367449155.
- Singh M, Singh G.R, Karkute S, Tiwari K.S. (2016).** Biology of *Solanum lycopersicum* (Tomato). Book · April 2016.
- Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L. (2003).** Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7554-7557.
- Small E. (1978).** A numerical taxonomic analysis of the *Daucus carota* complex. *Canadian Journal of Botany* 56: 248-276.
- Snoussi S. (2010).** Rapport de mission : Etude de base sur la tomate en Algérie. Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural, Direction des statistiques. (MADR).
- Steyn P.S. (1998).** The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Méd Vét*, 149, 6: 469-478.
- Stiles J, Penkar S, Plockova M, Chumchalova J, Bullerman L.B. (2002).** Antifungal activity

of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*, Journal of Food Protection, 65, 1188-1191.

**Stiles M.E, Holzapfel W.H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.

**Stoyanova L.G, Ustyugova E.A, Netrusov A.I. (2012).** Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties, Applied Biochemistry and Microbiology, 48, 229-243.

**Ström K, Schnurer J, Melin P. (2005).** Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression, FEMS Microbiology Letters, 246,119-124.

**Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J. (2002).** *Lactobacillus plantarum* MiLAB393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyllactic acid, Applied Environmental Microbiology, 68,4322-4327.

**Ström K. (2005).** Fungal inhibitory lactic acid bacteria, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

**Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-Włoch M, Maresz K, Heczko P.B. (2005).** The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*, Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 13, 69-75.

**Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc A.L, Habjanic K, Matosic S. (2010).** Antimicrobial activity- the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technol. Biotechnol. 48, 296–307.

**Tabuc C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest. Spécialité: pathologie, mycologie, génétique et nutrition. 190p.

**Tailliez Patrick. (2001).** Mini revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

**Taylor. (1986).** Tomatoes. *CABI Publishing*, 1-4.

**Terzaghi B.E, Sandine W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied and environmental Microbiology, 29, 1975, pp. 807-813. ISSN: 0099-2240 (print), 1098-5336 (online).

**Teuber M, Geis A. (2006).** The genus *Lactococcus*. Prokaryotes 4: 205-228. their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

**Thierry A, Pogačić T, Weber M and Lortal S. (2015).** Production of Flavor Compounds by

- Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods, in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, eds. F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 314–340. doi:10.1002/9781118868386.ch19.
- Thomas T.D. (1973).** Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from the other bacteria. *N.Z.J.Dairy. Sci. Technol.* 8: 70 - 71.
- Tirilly Y et Bourgeois C.M. (1999).** Technologie des légumes. Éditions Tec & Doc, 558 p.
- Todorov S.D. (2009).** Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* Production genetic organization. *Braz. J. Microbiol.* 40, 209–221.
- Tormo H, Djamila A.H.L, Roques C. (2015).** Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 210:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002>
- Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, Ohtani K, Kodama M, Akagi Y, Egusa M, Yamamoto M, Otani H. (2013).** Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 2013, pp. 44-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x>
- Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, De Candia S, Lavermicocca P. (2009).** Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products, *Systematic and Applied Microbiology*, 32,438-448.
- Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, Visconti A. (2004).** Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation, *FEMS Microbiology Letters*, 233,289-295.
- Valkonen J.P.T, Koponen H. (1990).** The seed -borne fungi of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Plant Pathology*; 39: 510 - 516.
- Van Wyk B.E and Wink M. (2004).** Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses. Portland, Timber Press.
- Vandamme P, Pot B, Gillis B, de Vos P, Kersters K, Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 60:407-438.
- Verma N, Verma S. (2010).** *Alternaria* diseases of Vegetable Crops and New Approaches for its Control. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*.1: 681-692.
- Virginia Elena Fernández Pinto and Andrea Patriarca. (2017).** *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1542, DOI 10.1007/978-1-4939-6707-0\_2.

- Visconti A, Bottalico A, Solfrizzo M, Palmisano F. (1988).** Iso altenuene, a new metabolite of *Alternaria alternata*. Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology. 1: 139-140.
- Visconti A, Sibilio A. (1994).** *Alternaria* toxins. In: Miller, J.D. and Trenholm, H.L. (Eds.) Mycotoxins in grain. Eagan Press, St. Paul, MN, USA. 315-336.
- Vivek B.S et Simon P.W. (1999).** Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). Theoretical and Applied Genetics 99: 58-64.
- Vloutoglou I, Kalogerakis S.N. (2000).** Effects of inoculum concentrations, wetness duration and plant age on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. Plant Pathol. 49: 339-345.
- Vollenweider S, Lacroix C. (2004).** 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:16-27.
- Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopoulos P, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. (2010).** Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products, Food Control, 21, 136-142.
- Wang S.L, Hsiao W.J, Chang W.T. (2002).** Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCR31499 in a shrimp and crab shell powder medium. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2002, pp. 2249–2255. DOI: 10.1021/jf011076x.
- White T. J, Bruns T.D, Lee S.B, Taylor J.W. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis, M. A. – Gelfand, D. H. – Sninsky, J. J. – White, T. (Eds.): PCR protocols – A guide to methods and application. New York: Academic Press, 1990, pp. 315–322. ISBN: 9780123721815.
- Wiltshire S.P. (1933).** The foundation species of *Alternaria* and *Macrosporium*. Trans Br Mycol Soc 18:135–160
- Woudenberg J.H.C, Van der Merwe N.A, Jurjevic Z, Groenewald J.Z, Crous P.W. (2015).** Diversity and movement of indoor *Alternaria alternata* across the mainland USA, *Fungal Genetics and Biology* 81 62–72.
- Yang E.J, Chang H.C. (2010).** Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. Int. J. Food Microbiol. 139, 56–63.
- Yu W, Yu F.Y, Undersander D.J, Chu F.S. (1999).** Immuno assay of selected mycotoxins in hay, silage and mixed feed. Food Agricultural Immunology. 11: 307-319.
- Zacharof M.P, Lovitt R.W. (2012).** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review

article. APCBEE Procedia, 2, 50–56.

**Zamfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B, Swings J, De Vuyst L. (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* 29:487-495. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.10.002>

**Zarour K, Benmechernene Z, Hadadji M, Moussa Boudjemaa B, Henni D.J. et Kihal M. (2012).** Bioprospecting of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from Algerian raw camel and goat milk for technological properties useful as adjunct starters. *Afr JI of Microb Res Vol.* 6(13), pp. 3192-3201

**Zarour K. (2010).** Contribution à l'étude microbiologique et technologique des espèces de *Leuconostocmesenteroides* isolées de différents écosystèmes. Mémoire de Magister. Université Ahmed BenBella Oran1.

**Zhang Heping, cai Yimin. (2014).** Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice. Doedrecht; Heidelberg; New York: Springer; ISBN: 978-94-017-8840-3.

**Zouhir A, Hammami R, Fliss I, Hamida J.B. (2010).** A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein J*, 29, 432-439.

**Zourari A, Accolas J.P, Desmazeaud M.J. (1992).** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait* 72.1-34.

**Site internet:**

**Blancard D. (2020).** <http://ephytia.inra.fr/fr/C/24048/Tropileg-Alternariose-de-la-tomate-A-linariae>. (INRA).

# **Annexe**

## ANNEXE N° 1

**Milieux de culture utilisés****Milieu MRS (De Man, Rogosa and Sharpe)**

Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Glucose	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,2

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

**Milieu MRS-BCP sans extrait de viande**

MRS sans extrait de viande

(milieu liquide) 1000 ml

Pourpre de Bromocrésol 0,025 mg

pH = 7.0

**Eau physiologique**

Chlorure de sodium	8,5 g
Peptone	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

**Lait écrémé**

Lait écrémé	100 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7

Autoclavage 110°C, 10 minutes.

**Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pommes de terre	200g
-----------------	------

**Milieu M17 agar**

Peptone tryptique de caséine	2,5g
Peptone pepsique de viande	2,5g
Peptone papainique de soja	5g
Extrait de levure	2,5g
Extrait de viande	5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium,7H <sub>2</sub> O	0,25g
Acideascorbique	0,5g
Lactose	5g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,8

Autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

**Milieu MSE (Mayer, Sandine et Elliker)**

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Saccharose	100 g
Citrate de sodium	1 g
Glucose	5 g
Gélatine	2,5 g
Azothhydrate de sodium	0,075 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6,5

Autoclavage 121°C, 15 minutes.

**Milieu M16BCP**

Peptone papainique de soja	5g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Lactose	2g
Acide ascorbique	0,5g
Acétate de sodium	1,8g

Dextrose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,5

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

**Milieu Czapek Agar (CZP)**

Nitrate de sodium	3,0 g
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Sulfate de fer	0,01 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g

Saccharose 3 0,0 g

Agar 15g

Eau distillée 1000 ml

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

**Milieu OMA (Oatmeal, Malt, Agar)**

Flocon d'avoine	80g
Extrait de malt	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,5

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

**Milieu Agar 2 %**

Agar agar	20g
Eau Distillée Q.S.P.	100ml

pH 6,8

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

L'arginine	4g
Pourpre de bromocrésol	0,05g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,8

Autoclavage : 120°C, 20 minutes.

**Milieu KMK (Kempler et Mc Kay)**

Extrait de levure	3 g
Biopolytone	2,5 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=6.6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon, puis autoclavé (121°C, 15min). Au moment de l'emploi, 1 ml d'une solution aqueuse de ferricyanide de potassium 10 % (p/v) et 1 ml d'une solution aqueuse à 2.5 % (p/v) de citrate ferrique et citrate de sodium (p/p) sont ajoutés. Ces solutions sont stérilisées par filtration (millipores 0.22 µm) et sont conservées à l'obscurité à +4°C.

**Milieu Malt Extract agar (MEA)**

Extrait de malt	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 6,5

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

---

**ANNEXE N° 2****Mélanges réactionnels de PCR :****Mix PCR pour 1 échantillon**

taq DNA buffer (10 X)	5µl
dNTP mix (40mM)	4µl
Primer I (F27)	2µl
Primer II (R1492)	2µl
Taq DNA (5µ/µl)	1µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2µl
ADN	2µl
H <sub>2</sub> O U.P	32µl

**Dilution d'ADN pour séquençage de 1 échantillon**

Mix taq buffer (2X)	25µl
Primer I	2µl
Primer II	2µl
H <sub>2</sub> O U.P	20µl
ADN	1µl

**Gel d'agarose 1%**

TAE Buffer	50ml
Agarose	0.5g
Bromure d'éthidium	5µl

---

## ANNEXE N° 3

### Publications et communications

#### Publications :

**Younes Zabouri**, Abderrahim Cheriguene, Fadela Chougrani, Yamina Merzouk, Alessia Marchetta, Clara Urzì, Filomena De Leo. (2021). Antifungal activity of lactic acid bacteria against phytopathogenic *Alternaria alternata* species and their molecular characterization. 2021 National Agricultural and Food Centre (Slovakia). Journal of Food and Nutrition Research Slovakia (ISSN 1336-8672)

#### Communications :

**Younes Zabouri**, Abderrahim Cheriguene, Fadila Chougrani, Yamina Merzouk, Clara Urzi et De Leo Filomena. Activité anti fongique des Bactéries Lactique vis à vis des champignons phytopathogènes. VII<sup>ème</sup> Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. **Université de Mostaganem, 26-27 Avril 2017.**

**Younes Zabouri**, Benichou S.L, Hamini N, Yezli W, Kihel M et Henni D.E. Etude de l'activité pectinolytique et pouvoir pathogène chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *Albeenis* agent pathogènes du palmier dattier. Seminaire internatiobal "protection des cultures stratégiques en algeries: situation et perspection d'avenir" à l'Université Hassiba Benbouali. **chlef, 28-29 et 30 Mai 2013.**

**Younes Zabouri**, Kihel M, Henni D.E, Karkachi N. Etude de l'activité pectinolytique, pouvoir pathogène et compatibilité vegetative chez *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*. Seminaire National sur la protection des plantes cultivées tenu au centre Universitaire. **Khemis Miliana, 25, 26 Mais 2010.**